



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Microbiologia Médica e Imunologia I

Manual dos Trabalhos Práticos de Laboratório

Maria Cristina Queiroga

Marta Laranjo

Título:

Microbiologia Médica e Imunologia I-Manual dos Trabalhos Práticos de Laboratório

Autores:

Maria Cristina Queiroga

Marta Laranjo

ISBN:

978-972-778-154-6

Edição:

1ª Edição (fevereiro 2020)

Índice

Introdução.....	5
1 - Ubiquidade Microbiana.....	6
Introdução.....	6
Material.....	6
Protocolo experimental	6
Questionário.....	8
2 - Métodos de Sementeira.....	9
Introdução.....	9
Material.....	9
Protocolo experimental	10
Questionário.....	11
3 - Observação Microscópica de Bactérias.....	12
Introdução.....	12
Material.....	12
Protocolo experimental	12
Questionário.....	16
4 - Propagação de Bactérias Aeróbias.....	17
Introdução.....	17
Material.....	17
Protocolo experimental	18
Questionário.....	19
5 - Isolamento de Bactérias Aeróbias.....	20
Introdução.....	20
Protocolo experimental	20
6 - Identificação de Bactérias Aeróbias	22
Introdução.....	22
1. Bacilos Gram-negativo	23
Material.....	23
Protocolo experimental	23
2. Cocos Gram-positivo.....	23
Material.....	23
Protocolo experimental	24
Interpretação dos resultados dos APIs.....	24
Questionário.....	30

7 - Identificação Molecular de Bactérias	31
Introdução	31
Objetivo	31
Extração de DNA	31
Material	31
Protocolo experimental	32
Reação em Cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>)	33
Material	33
Protocolo experimental	33
Eletroforese em Gel de Agarose	35
Introdução	35
Procedimento Experimental	35
8 - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	37
Introdução	37
Material	37
Protocolo experimental	37
Interpretação dos antibiogramas	38
Questionário	40
9 - Propagação e Isolamento de Bactérias Anaeróbias	41
Introdução	41
Material	45
Protocolo experimental	45
Questionário	46
10 - Quantificação de Populações Bacterianas	47
Introdução	47
Contagem do Número de Microrganismos Viáveis Totais	48
Material	48
Protocolo experimental	48
Determinação do Número Mais Provável de Coliformes	49
Material	49
BIBLIOGRAFIA	51

Introdução

Nas aulas práticas de Microbiologia Médica, através do desenvolvimento dos trabalhos práticos, os alunos aprendem baseados na experiência *hands-on*, como é recomendado pela European Association of Establishments for Veterinary Education (EAEVE). Estas aulas conferem competências técnicas e científicas aos estudantes, assim como competências comunicacionais de nível científico, adequadas à comunicação de conhecimentos médicos.

Este manual é constituído pelas fichas de trabalho das aulas práticas da unidade curricular “Microbiologia Médica e Imunologia I”. As fichas são guias de procedimentos a utilizar nas aulas práticas laboratoriais.

No final de cada protocolo, são apresentadas perguntas chave sobre a matéria da aula. Devem responder às perguntas em casa e, no início aula seguinte, cada aluno expõe as suas respostas, seguindo-se uma discussão com todos os alunos e o docente. Nesta altura, o docente corrige cada pergunta, para que fiquem esclarecidos. Aconselha-se que escrevam no manual a resposta certa.

Bom trabalho.

1 - Ubiquidade Microbiana

Introdução

Os microrganismos encontram-se distribuídos por toda a parte – distribuição ubiqüitária. Este trabalho tem como finalidade demonstrar essa particularidade, e alertar para os cuidados a ter no laboratório para evitar contaminações e falsos resultados.

Este exercício prático, irá desenvolver-se em duas aulas consecutivas:

- 1ª) Inoculação de meios de cultura.
- 2ª) Observação dos resultados.

Material

- 4 placas de Petri com meio sólido (agar nutritivo)
- 2 caldos nutritivos
- 2 zaragatoas

Protocolo experimental

1. Identificar corretamente cada placa ou tubo com:
 - ✓ data
 - ✓ nome ou grupo
 - ✓ operação a efetuar

2. Meio sólido

Abrir uma placa de Petri e efetuar uma das seguintes operações:

- ✓ Deixar uma placa aberta sobre a bancada durante o resto da aula.
 - ✓ Aplicar os dedos sobre a gelose. Lavar cuidadosamente as mãos e aplicar os dedos sobre a gelose.
 - ✓ Tossir para dentro da placa
 - ✓ Pôr um cabelo dentro da placa.
3. Meio líquido
 - ✓ Passar uma zaragatoa sobre a bancada e mergulhá-la num dos tubos de meio líquido.

- ✓ Com uma zaragatoa fazer uma recolha num dos elementos do grupo (boca, nariz, orelha, couro cabeludo) e mergulhá-la num dos tubos de meio líquido.
4. Incubar as placas invertidas e os tubos na estufa a 37 ° C durante 24h.
5. Após o período de incubação, examinar as placas e os tubos, anotando:
- ✓ O número e diferentes tipos de colónias que se desenvolveram nos meios sólidos
 - ✓ O grau e tipo de turvação dos tubos com meio líquido
6. Observar o aspeto das diferentes colónias relativamente a:
- ✓ dimensão (diâmetro, expresso em milímetros)
 - ✓ forma (circular, oval, lenticular, irregular, rizoide, ...)
 - ✓ margem (inteira, ondulada, lobada, ...)
 - ✓ elevação (plana, elevada, convexa, ...)
 - ✓ superfície (lisa, rugosa, ondulada, granulosa, baça, brilhante, ...)
 - ✓ características óticas (opaca, translúcida, opalescente, iridescente, ...)
 - ✓ consistência (seca, mucoide, pulverulenta, ...)
 - ✓ cor (branca, amarela, esverdeada, ...)

Questionário

1. O que é uma colónia bacteriana? O que é uma unidade formadora de colónia (UFC)?
2. Qual a importância e significado prático da ubiquidade microbiana?
3. Quais as precauções a tomar para controlar os possíveis contaminantes de laboratório?
4. Quais os meios de esterilização mais frequentemente utilizados na rotina laboratorial?

2 - Métodos de Sementeira

Introdução

Na manipulação dos microrganismos em laboratório são utilizadas várias técnicas para a sua propagação nos diferentes meios de cultura. Algumas destas técnicas laboratoriais foram desenvolvidas já no tempo da Escola de Koch.

As amostras que chegam ao laboratório contêm uma flora mista (**cultura mista**), pelo que o primeiro objetivo é fazer a separação dos vários microrganismos para obtenção de colónias individualizadas, e assim possibilitar, não só a sua observação cuidada, como o seu isolamento, para obtenção de **culturas puras**.

Outras técnicas de cultura visam a obtenção de grandes quantidades de microrganismos ou de culturas homogéneas com uma quantidade relativamente controlada de bactérias.

Outras técnicas ainda têm como objetivo a recuperação de todos os microrganismos viáveis numa amostra, permitindo a contagem de bactérias presentes, através da contagem das respetivas colónias resultantes.

Material

- Cultura mista em meio líquido
- Cultura mista em meio sólido
- Tubos com caldo nutritivo (2/grupo)
- Tubos com agar nutritivo inclinado (1/grupo)
- Tubos com *Plate Count Agar* (1/grupo)
- Placas com agar nutritivo (6/grupo)
- Placas de Petri estéreis (1/grupo)
- Tubos com soro fisiológico (1/grupo)
- Semeadores de vidro (1/grupo)
- Pipetas Pasteur (2/grupo)
- Zaragatoas (2/grupo)
- Ansas e fios retos

Protocolo experimental

TRANSFERÊNCIA DE CULTURA EM MEIO LÍQUIDO PARA MEIO SÓLIDO

- **Inoculação à superfície**
 - ❖ Esgotamento
 - ✓ Por estria – com uma ansa esterilizada, recolher uma ansa cheia de cultura em meio líquido (inóculo), espalhar numa pequena área do meio sólido, junto á borda da placa, constituindo assim o reservatório. A partir daqui traçar estrias paralelas com a ansa.
 - ✓ Com semeador de vidro (ou descartável) – com uma pipeta de Pasteur esterilizada, recolher uma gota de inóculo, deitar numa placa com meio sólido, espalhar com o semeador. Com o mesmo semeador, voltar a passar numa segunda placa, e depois, da mesma forma, numa terceira placa.

- **Inoculação em profundidade**
 - ✓ Por incorporação – Numa placa de Petri esterilizada, deitar uma porção (por ex: 1 ml) de cultura em meio líquido. Deitar o meio sólido fundido e arrefecido a cerca de 50°C. Rodar a placa para misturar bem o inóculo com o meio de cultura, mas com cuidado para a mistura não tocar na tampa.

TRANSFERÊNCIA DE MEIO SÓLIDO PARA MEIO SÓLIDO

Os métodos utilizados neste tipo de transferência são os mesmos que se utilizam na transferência meio líquido-meio sólido, mas o inóculo é constituído por um pouco de cultura em meio sólido, que é recolhido utilizando a ansa, o fio ou a zaragatoa.

- **Inoculação à superfície**
 - ❖ Esgotamento por estria

 - ❖ Sementeira em toalha – utilizar uma zaragatoa esterilizada. Recolher uma colónia e fazer uma suspensão em soro fisiológico. Inocular o meio sólido, passando a zaragatoa segundo várias direções, de forma a se obter uma cultura homogénea.

 - ❖
- **Inoculação em profundidade**
 - ❖ Por picada – recolher uma colónia bem isolada e inocular em meio sólido contido num tubo de ensaio, espalhando a cultura na rampa e, por fim, espetando o fio no agar.

TRANSFERÊNCIA DE MEIO SÓLIDO PARA MEIO LÍQUIDO

Com uma ansa esterilizada, recolher um pouco de cultura do meio sólido. Mergulhar a ansa no meio líquido, agitando-a para soltar o inóculo.

TRANSFERÊNCIA DE MEIO LÍQUIDO PARA MEIO LÍQUIDO

Recolher um pouco de cultura em meio líquido, utilizando uma pipeta de Pasteur esterilizada. Deitar algumas gotas num tubo com meio líquido.

Questionário

1. Que métodos de sementeira por esgotamento conhece? Qual o objetivo da sementeira por esgotamento?
2. Qual o objetivo da sementeira em toalha? Dê um exemplo prático da utilização deste método.
3. O que é a escala de Mac Farland? Para que serve?
4. Caracterize o método de sementeira por incorporação, e diga em que situações práticas se aplica.

3 - Observação Microscópica de Bactérias

Introdução

Os microrganismos só podem ser observados mediante a utilização do microscópio. É necessário preparar a cultura de forma a permitir a observação.

As **preparações a fresco** permitem observar os microrganismos em vida, possibilitando, por exemplo, verificar se são móveis.

As **preparações fixadas e coradas** permitem uma observação mais clara da morfologia dos microrganismos.

NOTA: Observação microscópica:

- Ocular 10x
- Objetiva 100x
- Condensador subido
- Óleo de imersão sobre a preparação microscópica.

Material

- lâminas
- lamelas
- ansas

Protocolo experimental

EXAME A FRESCO

❖ Motilidade, viabilidade.

-Entre lâmina e lamela

TÉCNICA

1. Preparar uma suspensão bacteriana sobre a lâmina.
2. Cobrir com uma lamela.
3. Se se pretende fazer uma observação demorada, cercar a lamela com parafina ou com verniz.
4. Observar ao microscópio - inicialmente com objectiva de 40 X e depois com objectiva de imersão.

EXAME APÓS FIXAÇÃO E COLORAÇÃO

Existem **colorações simples** e **colorações diferenciais**. As **colorações simples** permitem observar a morfologia individual e morfologia de associação das bactérias, algumas são utilizadas para visualizar estruturas específicas (cápsulas, esporos, cílios, grânulos metacromáticos, etc). As **colorações diferenciais** permitem apreciar características que diferem com os grupos de microrganismos: coloração de Gram (permite distinguir a constituição da parede bacteriana – Gram+ / Gram-), coloração de Ziehl-Neelsen (permite averiguar a presença de ácidos micólicos (lípidos) que conferem o carácter de ácido-resistência - *Mycobacterium* sp. , *Nocardia* sp. ,etc.).

As **colorações específicas** são utilizadas quando os microrganismos em estudo (ou sob suspeita) não coram com os métodos mais utilizados: coloração de Stamp (para observação de espiroquetas), coloração para riquetsias, etc..

Material

- lâminas
- lamelas
- ansas

Protocolo experimental

1. Coloração simples

- ❖ Forma, estrutura, dimensões, modo de associação.

REAGENTES

- Álcool metílico
- Solução de azul de metileno

TÉCNICA

1. Secar a preparação microscópica.
2. Fixar com álcool metílico 5 -10 min., depois entornar o álcool.
3. Corar com solução de azul de metileno 5-10 min.
4. Lavar com água e secar.
5. Observar ao microscópio.

2. Coloração de Gram (coloração diferencial) – Figura 1

- ❖ Forma, estrutura, dimensões, modo de associação.
- ❖ Diferenciação por reação à coloração: Gram positivo / Gram negativo.

REAGENTES

- Solução de Violeta de Genciana (ou Cristal Violeta)
- Solução de Lugol: Iodo 1g
Iodeto de potássio 2g
Água destilada 300 ml
- Álcool-acetona
- Solução de fucsina (ou de safranina)

TÉCNICA

1. Secar a preparação microscópica.
2. Fixar pelo calor.
3. Corar com Violeta de genciana – 3 min (ou cristal violeta - 1 min).
4. Escorrer o corante, lavar com o mordente (solução de lugol) e cobrir a lâmina – 1,5 min.
5. Lavar com água.
6. Diferenciar com álcool-acetona.
7. Lavar com água.
8. Contrastar com safranina (ou fucsina) - 30 seg.
9. Lavar com água e secar.
10. Observar ao microscópio.

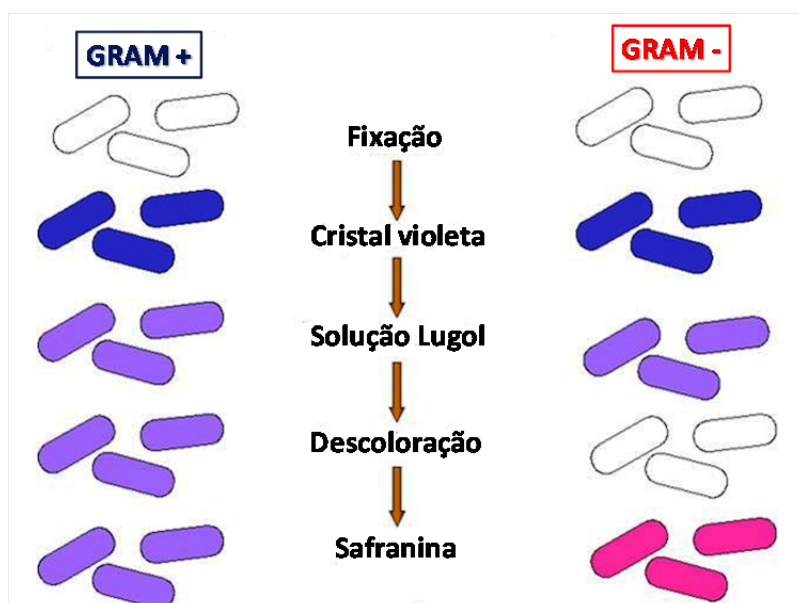


Figura 1. Coloração Gram.

3. Coloração de bacilos álcool-ácido-resistentes-Método de Ziehl-Neelsen – Figura 2

- ❖ Diferenciação por reação à coloração: ácido-álcool resistente / sensível.

REAGENTES

- Fucsina de Ziehl
- Álcool clorídrico a 3%
- Solução de azul de metileno

TÉCNICA

1. Fixar o esfregaço com álcool metílico – 10 min.
2. Escorrer.
3. Corar com fucsina, aquecendo a lâmina até à emissão de vapores 2 ou 3 vezes - 15 min.
4. Escorrer o corante e diferenciar com álcool clorídrico (10 – 30 s).
5. Lavar com água.
6. Corar com azul de metileno - 30 seg.
7. Lavar com água e secar.
8. Observar ao microscópio.

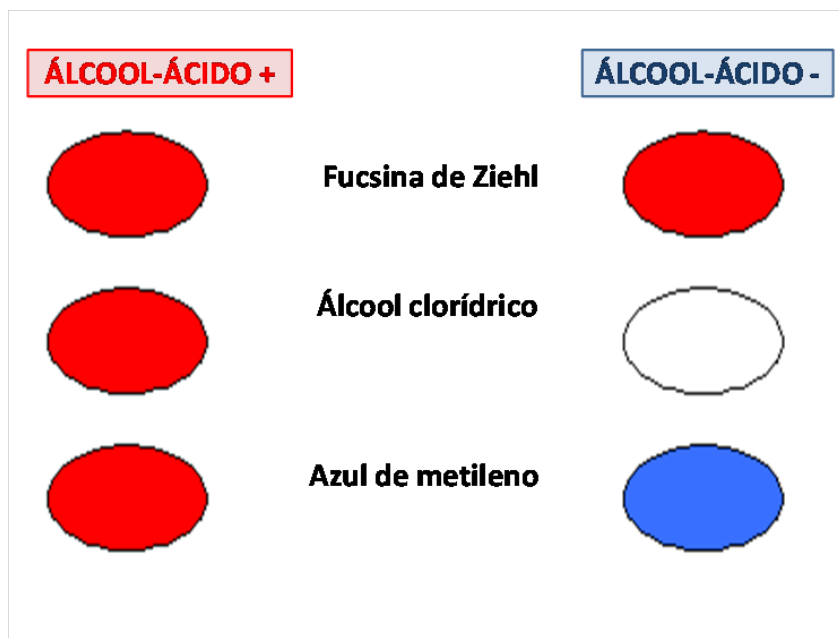


Figura 2. Coloração de bacilos álcool-ácido-resistentes (Ziehl-Neelsen).

Questionário

1. Para que serve a coloração de Gram?
2. De que estruturas celulares depende a reação ao Gram?
3. Qual o interesse clínico da coloração de Ziehl-Neelsen (ácido-resistente)?
4. A que se deve a ácido-resistência?

4 - Propagação de Bactérias Aeróbias

Introdução

No grupo de aulas que vamos iniciar, vamos simular uma análise bacteriológica de rotina.

Há situações específicas em que a epidemiologia, história pregressa e lesões podem levar a suspeitas que requeiram metodologias próprias. É o caso da pesquisa de:

- Espiroquetas: *Serpulina*, *Borrelia*, *Leptospira*;
- Gram-negativos aeróbicos/microaerófilos, móveis, forma helicoidal ou vibriónica: *Campylobacter*, *Vibrio*, etc;
- Gram-negativos aeróbicos / microaerófilos, cocos e coco-bacilos: *Brucella*;
- Riquetsias, clamídias, *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, etc.

A amostra que lhes é fornecida contém uma população bacteriana desconhecida, tal como acontece numa amostra clínica (Ex: zaragatoa de uma ferida, leite mamítico, pedaço de órgão colhido numa necropsia, etc).

Com o objetivo de diagnosticar a causa da afeção, utilizando algumas técnicas laboratoriais que já conhecem e outras que irão aprender, vamos propagar, isolar e identificar as bactérias no inóculo.

Cada grupo irá fazer preparações microscópicas, corá-las e observá-las, para fazer uma apreciação das características morfológicas e comportamento perante o Gram, das bactérias contidas na amostra.

Depois, irá propagar o inóculo em meios sólidos apropriados: um meio enriquecido – agar sangue (AS) – e um meio seletivo – agar *MacConkey* (MC) -, utilizando o método de sementeira por esgotamento por estria.

Desta forma, pretende obter-se maior quantidade de microrganismos, mas desta vez, sob a forma de colónias isoladas, possibilitando a observação da morfologia colonial, por um lado, e por outro lado, permitindo obter culturas puras, repicando uma só colónia para um novo meio de cultura.

Material

- Cultura mista num tubo com meio líquido
- Lâminas de vidro, corantes e microscópios
- Placa com agar *MacConkey* (MC)
- Placa com agar sangue (AS)
- Material de sementeira

Protocolo experimental

1. Fazer duas preparações microscópicas a partir do inóculo desconhecido.
2. Corar uma pelo método simples e outra pelo método de Gram.
3. Montar e observar ao microscópio com objetiva de imersão, fazendo um esquema ilustrativo do campo microscópico no quadro anexo.

Coloração Simples	Coloração de Gram

4. Com base na observação microscópica, verificar a pureza da cultura.
5. Fazer sementeiras por esgotamento por estria nas placas de AS e MC.
6. Incubar as culturas a 37°C, durante 24 horas.

5 - Isolamento de Bactérias Aeróbias

Introdução

Na última aula, a partir de um caldo com uma população bacteriana desconhecida, foram efetuadas sementeiras, em diferentes meios de cultura sólidos, para propagar o inóculo e verificar a pureza das culturas.

Pela observação das colónias nos referidos meios, poderá deduzir se se trata de culturas puras ou mistas e, neste caso, saber quantos tipos de colónias diferentes existem.

Além disso, através da repicagem, poderá produzir culturas puras necessárias para prosseguir com as provas para identificação das bactérias e testes de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.

Protocolo experimental

1. Observe as placas e registre as características macroscópicas culturais das colónias nos diferentes meios de cultura utilizados.

MacConkey	Agar sangue	Coloração de Gram

2. Inocule cada uma das colónias, nos meios de cultura apropriados, em conformidade com o quadro seguinte:

SITUAÇÃO	Nº de COLÓNIAS		INOCULAR EM:
	AS	MC	
A	1 ou 2	-	Para cada colónia: <ul style="list-style-type: none"> • 1placa de AS • 1tubo de CT
B	1	1	<ul style="list-style-type: none"> • 1 placa de MC • 1 tubo de K • 1 tubo de CT
C	2	1	Para cada colónia (do AS): <ul style="list-style-type: none"> • 1 placa de AS • 1 placa de MC • 1tubo de CT
D	2	2	Para cada colónia (do AS ou do MC): <ul style="list-style-type: none"> • 1 placa de AS • 1 placa de MC • 1tubo de CT

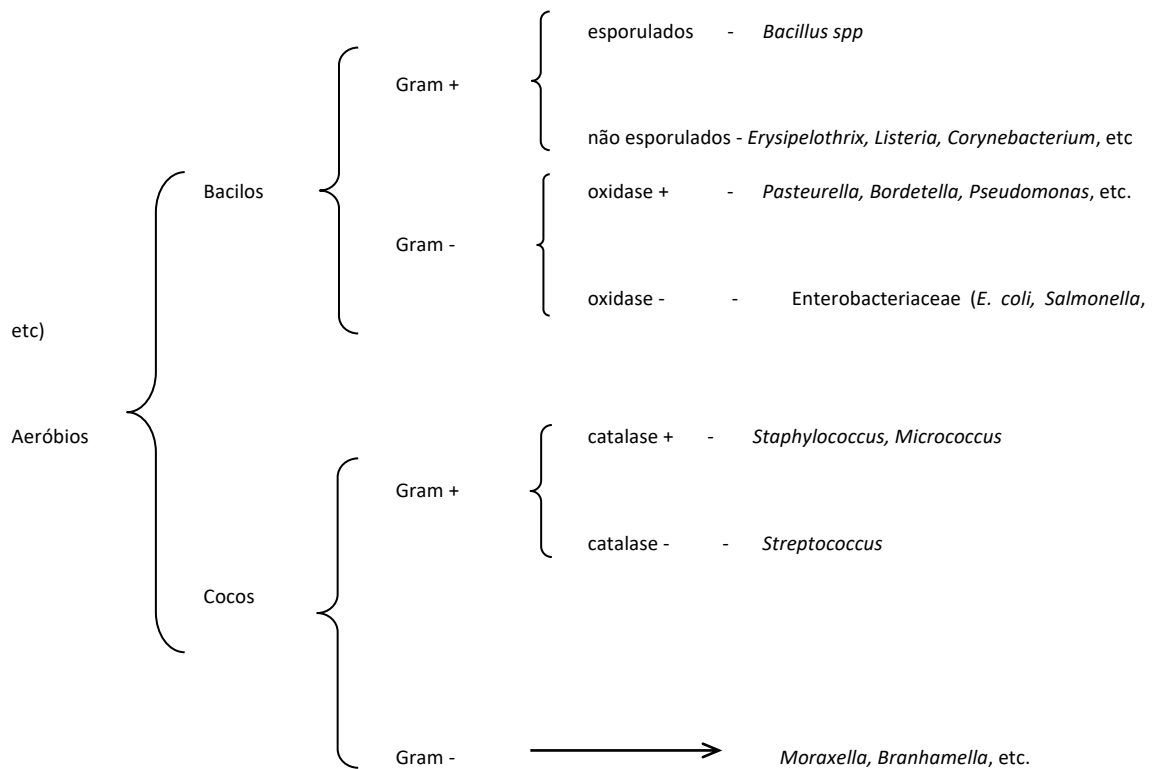
3. Inocule as colónias do MacConkey em meio de Kligler.

6 - Identificação de Bactérias Aeróbias

Introdução

A identificação até ao género e espécie das bactérias observadas é possível através da verificação das suas características enzimáticas.

Com base na observação **macro-** e **microscópica** da estirpe bacteriana a identificar, e de alguns testes rápidos (oxidase, catalase), selecionar qual o grupo de testes bioquímicos a executar.



Protocolo experimental

Fazer preparações microscópicas coradas pelo Gram a partir das culturas puras em AS.

RESULTADO DA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

1. Bacilos Gram-negativo

- ✓ Fazer a prova da oxidase

Material

- reagente da prova – aceitador de eletrões que cora de roxo quando é reduzido (Tetrametil ou dimetil-parafenilenodiamina)
- placas de Petri esterilizadas
- papel de filtro

Protocolo experimental

1. Recolher uma colónia bem isolada, com uma ansa descartável.
2. Depositar a colónia na fita, no local onde está o reagente.
3. Observar o resultado. Se a colónia adquirir uma coloração arroxeadada, o resultado é positivo.

- ✓ **Oxidase (+)** → o microrganismo não é uma enterobactéria
→ fazer provas bioquímicas correspondentes ou **API 20NE (*)**
- ✓ **Oxidase (-)** → o microrganismo provavelmente é uma enterobactéria
→ fazer provas bioquímicas para enterobactérias ou **API 20E (*)**

(*) Utilizar as instruções dos respetivos APIs para os executar.

Em alternativa fazer a identificação com base no Vitek – usar carta para microrganismos Gram-negativos (carta G-).

2. Cocos Gram-positivo

- ✓ Fazer o teste da catalase

Material

- reagente da prova: peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 10 volumes
- lâminas de microscópio.

Protocolo experimental

1. Recolher uma colónia bem isolada, tendo o cuidado de não arrastar meio de cultura (os glóbulos vermelhos do AS contêm catalase).
2. Depositar a colónia numa lâmina de microscópio.
3. Deitar, em cima da colónia, uma gota de reagente da prova.
4. Observar o resultado. Se houver libertação de bolhas de gás (O₂) o resultado é positivo.

✓ **Catalase (+)** → o microrganismo poderá pertencer ao género *Staphylococcus*
→ fazer provas bioquímicas adequadas ou **API Staph (*)**

✓ **Catalase (-)** → o microrganismo poderá pertencer ao género *Streptococcus*
→ fazer as respetivas provas bioquímicas ou **API Strep (*)**

(*) Utilizar as instruções dos respetivos APIs para os executar.

Em alternativa fazer a identificação com base no Vitek – usar carta para microrganismos Gram-positivos (carta G+).

(*) Utilizar as instruções dos respetivos APIs para os executar.

Interpretação dos resultados dos APIs

A interpretação dos resultados dos APIs pode não apresentar problema se o código obtido na folha de resultados corresponder a um microrganismo no catálogo analítico. No entanto, duas dificuldades podem surgir:

- o código obtido não consta do catálogo analítico. Isto pode dever-se a:
 - o inóculo não estava em cultura pura (e então o conjunto de reações bioquímicas obtido não se referia a uma determinada bactéria, mas ao conjunto das reações das duas, ou mais, bactérias na mistura);
 - o microrganismo isolado difere do perfil característico para a espécie e não consta do catálogo.
- o microrganismo identificado não corresponde ao responsável pelo processo mórbido em estudo. Isto acontece por:
 - deficiente colheita (houve contaminação da amostra durante a colheita);
 - contaminação durante o processamento no laboratório.

Perfil Numérico de API 20E - Código Normal de 7 dígitos – *E. coli*

OXI	—	0	
-			
ARA	—	2	2
+			
AMY	—	0	
-			
MEL	—	4	7
+			
SAC	—	2	
+			
RHA	—	1	
+			
SOR	—	4	5
+			
INO	—	0	
-			
MAN	—	1	
+			
GLU	—	4	4
+			
GEL	—	0	
-			
VP	—	0	
-			
IND	—	4	4
+			
TDA	—	0	
-			
URE	—	0	
-			
H ₂ S	—	0	1
-			
CIT	—	0	
-			
ODC	—	1	
+			
LDC	—	4	5
+			
ADH	—	0	
-			
ONPG	—	1	
+			

GLU — 0
 -
 GEL — 2 — 2
 +
 VP — 0
 -
 IND — 0
 -
 TDA — 0 — 1
 -
 URE — 1
 +
 H₂S — 0
 -
 CIT — 2 — 2
 +
 ODC — 0
 -
 LDC — 0
 -
 ADH — 2 — 2
 +
 ONPG — 0
 -

OXI — 4
 +
 ARA — 0 — 4
 -
 AMY — 0
 -
 MEL — 0
 -
 SAC — 0 — 0
 -
 RHA — 0
 -
 SOR — 0
 -
 INO — 0 — 0
 -
 MAN — 0
 -

OF/F — 0
 -
 OF/O — 2 — 3
 +
 MAC — 1
 +
 MOT — 4
 +
 N₂ GAS — 2 — 6
 +
 NO₂ — 0
 -



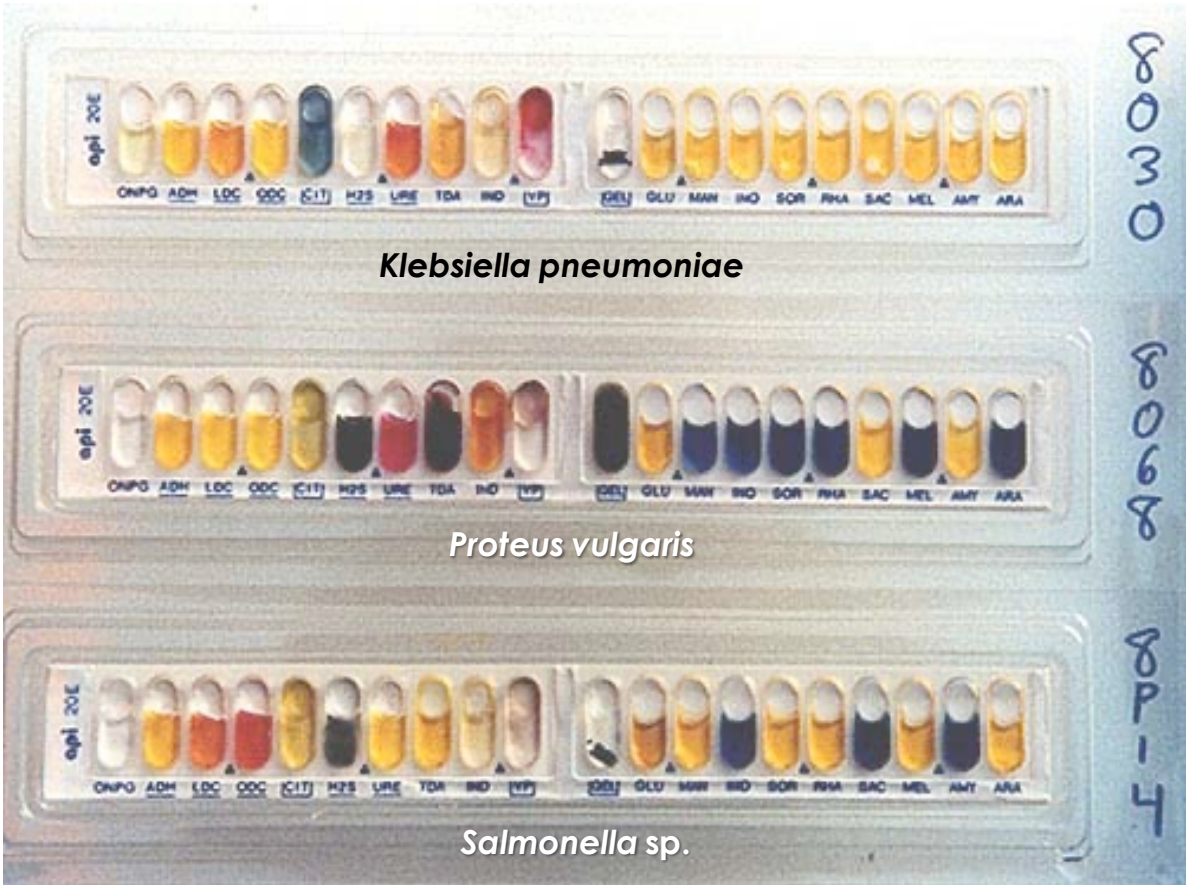
E. coli



Enterobacter agglomerans



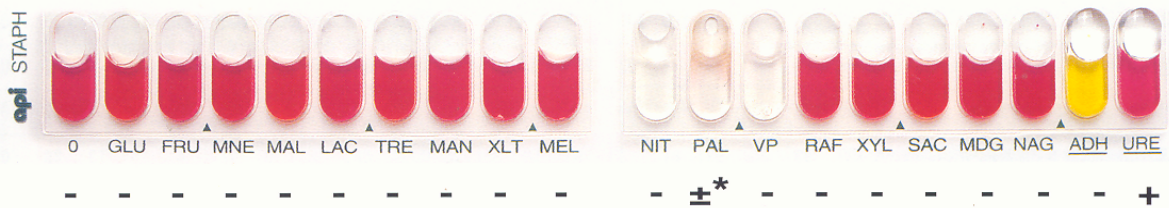
Edwardsiella hoshinae



api Staph

READING / LECTURE - INTERPRETATION

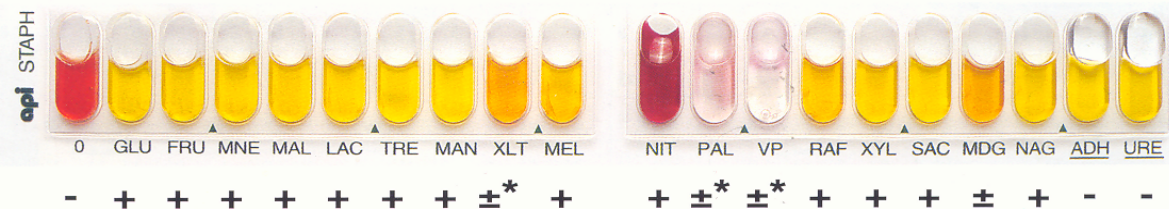
Micrococcus spp ATCC 700405



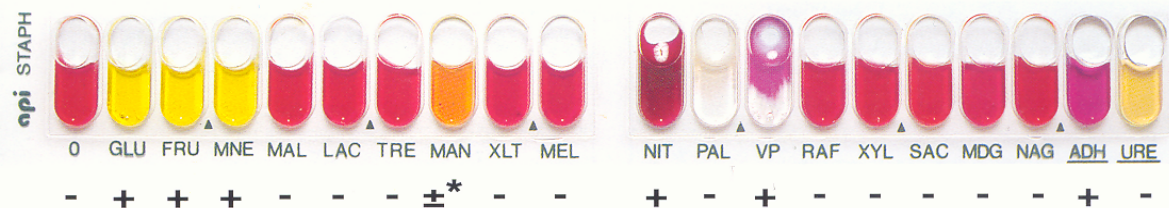
Staphylococcus xylosus ATCC 700404



Staphylococcus lentus ATCC 700403



Staphylococcus capitis ATCC 35661



*Reaction result may change over time / Le résultat de la réaction peut changer au cours du temps

Questionário

1. O que entende por identificação bioquímica?
2. Caracterize o método de identificação API.
3. Que outros métodos de identificação bioquímicos conhece?
4. Para além da identificação bioquímica, que outros métodos conhece?

7 - Identificação Molecular de Bactérias

Introdução

Estudos recentes em filogenia de bactérias sugerem que árvores filogenéticas baseadas em vários genes são mais fiáveis pois reproduzem mais corretamente a verdadeira filogenia dos organismos. No entanto, a análise do gene que codifica o RNA ribossomal 16S tem sido o mais frequentemente usado para definir a filogenia molecular e a taxonomia das bactérias. O gene do RNA ribossomal 16S é a única sequência disponível para a maioria das espécies bacterianas, incluindo estirpes tipo e um grande número de bactérias não cultivadas. Assim, a análise da sequência deste gene continua a ser uma boa ferramenta para identificar bactérias, pois permite determinar a posição de qualquer novo isolado relativamente às espécies conhecidas e taxonomicamente próximas. A identificação de bactérias é um passo essencial em muitas áreas da Biologia, Medicina e Medicina Veterinária (identificação de organismos patogénicos em humanos e animais), Agricultura (identificação de doenças em plantas, controlo de pragas), Indústria Alimentar (processos e controlo de qualidade), etc.

Objetivo

Identificar diversos isolados bacterianos desconhecidos (género e espécie) mediante sequenciação e análise do respetivo gene 16S rRNA.

Extração de DNA

Material

- microtubos
- micropipetas e pontas
- H₂O MQ
- Sarkosyl a 0,1%
- NaOH 0,05M
- gelo

EXTRAÇÃO RÁPIDA DE DNA TOTAL DE BACTÉRIAS

O DNA bacteriano total é extraído utilizando um método simples. O DNA só pode ser utilizado para PCR, por conter ainda muitas impurezas.

1. Ressuspender uma ansada de cultura em 200 µl de H₂O MQ.
2. Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
3. Desprezar o sobrenadante.
4. Ressuspender o *pellet* em 200 µl de *Sarkosyl* a 0,1%.
5. Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
6. Desprezar o sobrenadante.
7. Resuspender o *pellet* em 100 µl de NaOH 0,05M.
8. Ferver 4 minutos.
9. Colocar imediatamente em gelo.
10. Adicionar 600 µl de H₂O MQ.
11. Centrifugar 3 minutos a 4000 rpm.
12. Retirar 400 µl do sobrenadante para um novo microtubo.
13. Guardar a -20°C.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Material

- microtubos (1,5 mL)
- microtubos de PCR (0,2 mL)
- micropipetas e pontas
- H₂O MQ
- reagentes do PCR
- gelo

Protocolo experimental

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO RNAr 16S POR PCR

A amplificação do gene 16S rRNA de cada isolado bacteriano é feita usando os *primers* Y1 e Y3, correspondendo às posições 20 a 1507 do gene de *Escherichia coli*.

Num microtubo de PCR adicione os seguintes reagentes e concentrações finais: tampão de PCR 1X; 2.5 mM MgCl₂; 0.2 mM de cada dNTP; 15 pmol de cada primer e 1 U Taq DNA polimerase.

Reação de 50 µl (manter no gelo)

- 5 µl de tampão 10X
- 5 µl de MgCl₂ a 25 mM
- 1 µl de dNTP a 10 mM
- 3 µl de Y1 a 5 pmol/ µl
- 3 µl de Y3 a 5 pmol/µl
- 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase
- 1 µl de DNA total
- H₂O MQ - perfazer para 50 µl

Programa de amplificação

95°C 3 minutos

25 ciclos de:

94°C 1 minuto

62°C 1 minuto

72°C 2 minutos

72°C 3 minutos

10°C-pausa

Analise os produtos de PCR obtidos por eletroforese em gel de agarose.

Eletoforese em Gel de Agarose

Introdução

As moléculas de DNA, tal como proteínas, RNA e outros compostos biológicos possuem carga elétrica que, no caso do DNA é negativa. Assim, quando moléculas de DNA são colocadas num campo elétrico migram na direção do polo positivo. A separação das moléculas de acordo com o seu tamanho é efetuada por eletroforese através de um gel de agarose ou poliacrilamida, que formam uma rede complexa de poros. Apesar das moléculas de DNA terem a mesma forma e semelhante carga elétrica, ao serem forçadas a migrar através dos poros do gel separam-se de acordo com o seu diferente tamanho - quanto menor for a molécula mais rapidamente migra através do gel. Assim, a eletroforese em gel separa as moléculas de DNA de acordo com o seu tamanho.

A composição do gel determina a gama de tamanhos das moléculas de DNA que podem ser separadas. Por exemplo, um gel de agarose a 0,3%, possui poros relativamente largos, permitindo separar moléculas entre 5 e 60 kb de comprimento. Um gel de poliacrilamida a 40%, possui poros muito pequenos o que permite separar moléculas de DNA muito pequenas (de 1 a 300 pares de bases, pb) e permite distinguir moléculas que diferem entre si em apenas um nucleótido de comprimento.

A visualização das moléculas de DNA no gel é conseguida pela aplicação nos poços de uma solução de GelRed. Este composto é usado para visualizar o DNA; as bandas nas posições relativas aos diferentes tamanhos de fragmentos de DNA são visíveis mediante irradiação do gel com ultravioletas (U.V.)

A determinação da dimensão dos fragmentos de DNA observados é efetuada por comparação com marcador de peso molecular que consiste em vários fragmentos de DNA de dimensões conhecidas.

Procedimento Experimental

1. Prepare 50 ml de uma solução de agarose a 0,8% em tampão de eletroforese TAE 1X (Tris base 40 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1mM, pH 7,8,) ou TBE 0,5X (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8,3). Ferva no micro-ondas para dissolver a agarose.
2. Prepare o molde para o gel colocando o “pente” (para formar os “poços” para as amostras) e vedando com fita autocolante.
3. Quando a solução de agarose estiver a cerca de 50 °C agite suavemente e deite no molde do gel, sem deixar bolhas de ar.
4. Quando o gel estiver completamente solidificado retire o “pente” e a fita autocolante, com cuidado.
5. Coloque o gel na tina de eletroforese, já com tampão de eletroforese suficiente para cobrir o gel. Os “poços” devem ficar do lado do eléctrodo negativo.

6. Retire 5 μl de cada reação de PCR e adicione 2 μl de tampão de amostra (que contém um corante, como o *orange G* para visualizar a migração das amostras, e glicerol para conferir maior densidade à amostra facilitando assim a sua colocação no “poço”) e 2 μl de GelRed (para visualizar o DNA sob luz UV).
7. Aplique as amostras nos “poços”, registrando a sua posição. Aplique também cerca de 500 ng (5 μl) de um marcador de peso molecular de DNA.
8. Ligue a fonte de voltagem de modo a aplicar ao gel cerca de 80 V, durante aproximadamente 1 hora.
9. Quando o primeiro corante tiver percorrido cerca de 10 cm, desligue a fonte, retire o gel e observe as bandas de DNA mediante a colocação do gel num transiluminador de ultravioletas (UV) de 300 nm. Coloque uma régua graduada junto ao gel e tire uma fotografia no sistema *GelDoc*.
10. Identifique cada banda observada e determine a dimensão dos produtos de PCR obtidos tendo em conta a posição e dimensão das bandas do marcador utilizado.

8 - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Introdução

No trabalho prático executado anteriormente, foi identificado um determinado microrganismo, o qual se concluiu ser o agente etiológico do caso clínico em estudo.

De forma a se estabelecer a terapêutica adequada para a morbidade em questão, deverá ser verificada a suscetibilidade, da referida bactéria, a diferentes agentes antimicrobianos. O método de Kirby e Bauer é utilizado em rotina de laboratório para esse propósito.

Material

- Cultura pura da estirpe bacteriana a testar
- Solução fisiológica
- Zaragatoas esterilizadas
- Pipetas de Pasteur
- Escala de *Mc Farland*
- Placas de Petri com o meio de *Mueller Hinton* - com sangue (MHS), ou sem sangue (MH), conforme a bactéria
- Discos de antimicrobianos

Protocolo experimental

1. Fazer uma suspensão em soro fisiológico estéril, com uma turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de *Mc Farland*. Conforme o tipo de crescimento da bactéria a testar, usar agar de *Mueller Hinton* com sangue (MHS), ou sem sangue (MH).

Bactéria	Meio de Cultura
<i>Staphylococci</i>	MH
<i>Streptococci</i>	MHS
<i>Enterobacteriaceae</i>	MH
<i>Corynebacteriaceae</i>	MHS
<i>Bacilli</i>	MS

2. Mergulhar uma zaragatoa esterilizada na suspensão.
3. Retirar o excesso, comprimindo a zaragatoa de encontro às paredes do tubo.
4. Inocular a superfície de uma placa de MH ou MHS, consoante a bactéria em estudo (ver quadro).
5. Espalhar o inóculo em toda a superfície da placa, segundo 3 direções.
6. Deixar a placa em repouso, na bancada, durante 5 minutos.
7. Aplicar os discos dos antimicrobianos, usando um aplicador próprio ou uma pinça esterilizada. No caso de usar a pinça, usar seis discos por placa e colocá-los de modo a que haja uma distância mínima de 10 a 15 mm entre os discos, e a mesma distância entre os discos e o bordo da placa.
8. Identificar a placa.
9. Incubar as placas com os antibiogramas na estufa a 37o c durante 24 horas.

Aula seguinte

10. Medir os diâmetros das zonas de inibição de crescimento.
11. Consultar a tabela para interpretação dos diâmetros dos halos de inibição.

Interpretação dos antibiogramas

O halo de inibição do crescimento bacteriano, em volta do disco de determinado antimicrobiano, é tanto maior quanto maior for a suscetibilidade do microrganismo ao referido antimicrobiano. Mas vários fatores interferem neste processo, como por exemplo o poder de difusão da molécula. Assim, o mesmo diâmetro de halo de inibição para dois antimicrobianos diferentes não corresponde a poderes inibidores iguais. É por isso que se utilizam tabelas de interpretação padronizadas.

Estas tabelas especificam, para cada agente antimicrobiano, a correspondência em suscetibilidade dos microrganismos em relação à medida do diâmetro do halo. Por exemplo:

Agente antimicrobiano	Diâmetro do halo em mm.		
	Resistente (R)	Intermédio (I)	Sensível (S)
Estreptomicina (10 µg)	≤ 11	12 - 14	≥ 15
Cefoperazona (75 µg)	≤ 15	16 - 20	≥ 21

Uma bactéria que apresente um halo de inibição de 15 mm em volta do disco de estreptomicina é sensível a este antibiótico, enquanto que um halo com o mesmo diâmetro em volta do disco de cefoperazona indica que o microrganismo é resistente, não devendo, portanto, utilizar-se este agente antimicrobiano como terapêutica.

Por vezes, na zona de inibição de um quimioterápico, observam-se pequenas colónias. Este facto pode dever-se a:

- cultura mista em que um dos microrganismos é resistente ao antibiótico;
- bactérias mutantes, resistentes ao quimioterápico, estarem presentes na população (o uso deste agente antimicrobiano como terapêutica leva à seleção desta flora resistente). Neste caso deve considerar-se o microrganismo resistente (R) ao referido quimioterápico.

9 - Propagação e Isolamento de Bactérias Anaeróbias

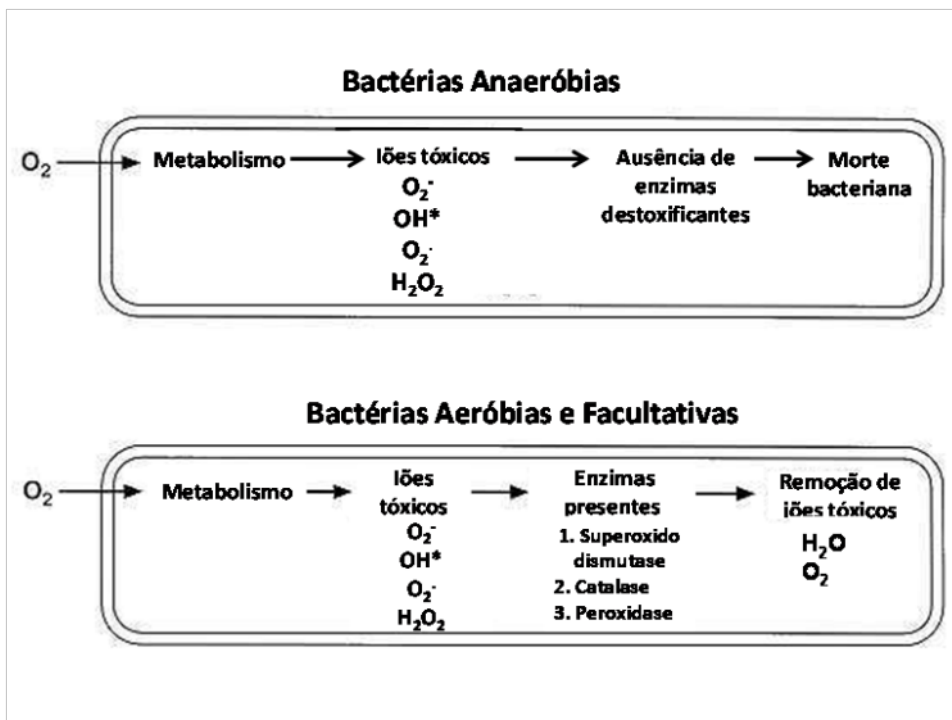
Introdução

O metabolismo celular das bactérias, na presença de oxigénio molecular (O_2), forma uma série de radicais de oxigénio tóxicos:

- anião superóxido - $O_2 + e^- \Rightarrow O_2^-$
- peróxido de hidrogénio - $O_2^- + e^- + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2$
- radical hidroxilo - $H_2O_2 + e^- + H^+ \Rightarrow H_2O + OH^*$ (é o mais tóxico, mas decompõe-se espontaneamente, com um tempo de semivida muito curto - 1/100 000 s)

As bactérias aeróbias possuem enzimas que decompõem estes radicais:

- superóxido dismutase - $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$
- catalase - $H_2O_2 + H_2O_2 \Rightarrow 2H_2O + O_2$
- peroxidase $H_2O_2 + NADH^+ + H^+ \Rightarrow 2H_2O + NAD^+$



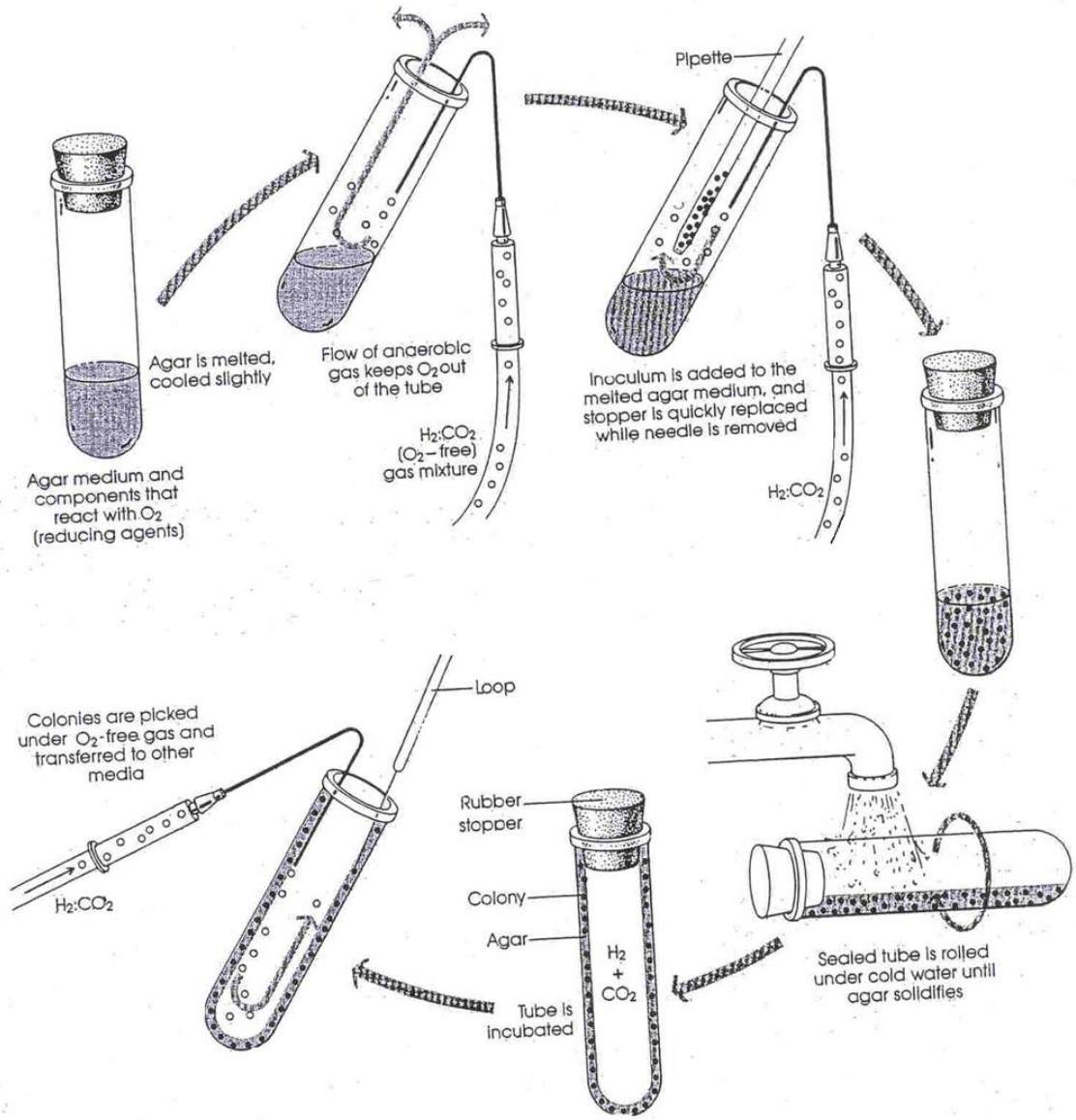
As bactérias anaeróbias, por não possuírem qualquer destas enzimas, não sobrevivem na presença de O_2 . Por isso, estes microrganismos requerem técnicas laboratoriais de cultura e isolamento especiais.

1. TÉCNICAS DE ISOLAMENTO

- ❖ Utilização de substâncias isolantes ou gelificantes (após regeneração do meio de cultura)
- ❖ Substituição da atmosfera primitiva por um gás inerte (estufa de anaerobiose; "glove box")
- ❖ "GASPAK" (jarra de anaerobiose com catalizador de Paladium)
$$\text{O}_2 + \text{H}_2 + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{Paladium}} \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$$
- ❖ "Anaerocult A" (jarra ou sacos de anaerobiose)
ác. cítrico + carbonato de sódio → citrato de sódio + CO_2 + água
pó de ferro + O_2 → óxido de ferro



❖ Técnica de Hungate – “roll tube technique”



2. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura devem ser ricos em nutrientes e conter substâncias redutoras.

❖ **Composição geral dos meios de cultura:**

- Peptona
- Carboidratos
- Sais
- Fatores de enriquecimento / crescimento
- Agentes redutores:
 - Tioglicolato de sódioL-cistina
 - Cisteína (cloridrato)
 - Fragmentos de órgãos (fígado)
 - Citrato de titânio (III)
 - Sulfureto de sódio
 - Ditiotreitol (cultura de bactérias metanogénicas)

Gelose com maior percentagem de agar

❖ **Meios de cultura utilizados:**

- Caldo Cooked Meat Medium
- Agar Wilkins-Chalgren

❖ **Preparação**

-Regeneração do meio Caldo Cooked Meat Medium
(100°C/10min, seguido de arrefecimento rápido)

-Composição do **Agar Anaeróbico Wilkins-Chalgren** (g/L)

Triptona	10.0
Digesto péptico de gelatina	10.0
Extrato de levedura	5.0
Glucose	1.0
Cloreto de sódio	5.0
L-arginina	1.0
Piruvato de sódio	1.0
Menadiona	0.0005
Hemina	0.005
Agar	10.0
pH = 7.1 ± 0.2	

Adicionar 5% de sangue de ovelha desfibrinado

❖ **Metronidazole**

O metronidazole é um antimicrobiano da classe dos nitroimidazóis. As bactérias anaeróbias estritas são sensíveis ao metronidazole porque possuem sistemas de transporte de eletrões de baixo potencial redox que estão ausentes nos aeróbios. A ferredoxina é um transportador de eletrões para o metronidazole, aceptor, gerando radicais de vida curta que infligem múltiplos tipos de dano celular e subsequente morte celular.

Material

- Amostra clínica (cultura mista em caldo Cooked Meat Medium)
- Placas com meio de Wilkins-Chalgren (W)
- Discos de metronidazole
- Sistemas de anaerobiose
- Indicador de anaerobiose

Protocolo experimental

1ª Sessão

1. Fazer uma preparação microscópica, corada pelo método de Gram modificado por Burk, diretamente a partir da amostra clínica fornecida.
2. Descreva as características microscópicas das bactérias observadas.
3. Inocular uma placa com meio de *Wilkins*, utilizando o método de esgotamento por estria.
4. Colocar um disco de metronidazole sobre as estrias (como demonstrado).
5. Preparar o sistema de anaerobiose (jarra ou saco). Introduzir o indicador de anaerobiose.
6. Incubar a 37°C, durante 48h.

2ª Sessão

1. Observar a placa inoculada.
2. Verificar a existência de colónias que não crescem nas imediações do disco de metronidazole (presuntivamente suspeitas).
3. Transferir a colónia suspeita para agar *Wilkins* e incubar anaerobicamente (sem disco de metronidazole).
4. Fazer a prova de ar para a mesma colónia, transferindo-a, também, para agar *Wilkins* e incubando aerobicamente.
5. Incubar a 37°C, durante 48h.

3ª Sessão

1. Se o microrganismo isolado não crescer em aerobiose, transferi-lo para o caldo *Cooked Meat*.
2. Confirmar o estado de pureza, fazendo uma preparação microscópica corada pelo Gram.
3. Identificar usando uma galeria API para anaeróbios (API 20A ou 32A).
4. Antibiograma se for anaeróbio Gram (-).

Questionário

1. Que condições exigem as bactérias anaeróbias estritas para o seu isolamento e crescimento laboratorial?
2. As substâncias redutoras que se adicionam aos meios de cultura para que servem?
3. Qual o agente redutor mais utilizado em bacteriologia gastrintestinal?
4. Caracterize a técnica de anaerobiose utilizado na sua sessão prática.
5. Que outras técnicas conhece?

10 - Quantificação de Populações Bacterianas

Introdução

Os microrganismos encontram-se associados de variadíssimas formas com os alimentos, influenciando a sua higiene, a sua qualidade e tornando certos alimentos e águas potencialmente patogénicos para o Homem. Como, em regra, os alimentos não são manipulados com assepsia, eles são alvo de permanente contaminação por microrganismos que os utilizam como substrato para o seu desenvolvimento.

A contaminação bacteriana dos alimentos ou águas pode ter diversas consequências, dependentes das bactérias envolvidas. Daí pode resultar a deterioração dos alimentos, com alteração das suas características organolépticas. Pode haver deposição de substâncias do catabolismo bacteriano capazes de provocar intoxicações alimentares. Pode ainda verificar-se transmissão ao Homem de doenças específicas, quando a contaminação envolve determinadas bactérias patogénicas.

Por outro lado, em algumas situações, é desejável permitir a multiplicação de determinados microrganismos que participam de modo benéfico no processamento de determinados alimentos. É o caso da produção do queijo e do iogurte ou ainda dos processos fermentativos envolvendo leveduras, dos quais são exemplo a produção do pão, do vinho e da cerveja.

Em qualquer dos casos é fundamental exercer um estreito controlo microbiológico dos alimentos e esse é o objeto da Microbiologia Alimentar.

Neste exercício prático serão demonstradas algumas técnicas geralmente usadas em microbiologia alimentar, aplicadas, a título de exemplo, à análise bacteriológica de leite:

- Contagem de bactérias viáveis totais.
- Contagem seletiva de bactérias viáveis (número mais provável - NMP), utilizando meios seletivos.

Para análises de controlo de qualidade microbiológica dos alimentos é importante poder determinar, além do nº total de bactérias viáveis, a presença de agentes microbianos específicos cuja presença não é aceitável nos alimentos. Para isso, é importante utilizar meios de cultura seletivos que permitam o desenvolvimento e enriquecimento de um só tipo de bactérias. Nesta aula será utilizado, a título demonstrativo, um meio seletivo geralmente usado em microbiologia alimentar: o caldo de Verde Brilhante, que permite a deteção de coliformes.

Contagem do Número de Microrganismos Viáveis Totais

Material

- Amostra de leite
- Tubos para diluições – Solução de Ringer (SR)
- Placas de Petri
- Tubos com *Plate Count Agar* (PCA)
- Micropipeta e pontas esterilizadas
- Leite da vacaria da Herdade da Mitra – ordenha da tarde conservado durante a noite no frigorífico.

Protocolo experimental

1. Preparar diluições crescentes da amostra em SR nos tubos distribuídos, na razão 1:10, até à diluição 10^{-6} .
 - 9 ml de SR + 1 ml da amostra = Volume total de 10 ml
2. Semear as 3 últimas diluições no meio fornecido, pelo método de incorporação:
 - Deitar 1 ml da amostra a semear na placa de Petri
 - Deitar o meio fundido a uma temperatura próximo de 50°
 - Misturar bem
 - Fazer 2 placas de cada diluição.
3. Identificar as placas:
 - - Identificação do grupo
 - - Referir a diluição
 -
4. Incubar a 30°C durante 48h.
5. Contar o número de colónias nas placas contendo entre 30 e 300.
6. Fazer a média do número de colónias contadas nas 2 placas semeadas com a mesma diluição.
7. Calcular:

N - nº total de bactérias viáveis da amostra (UFC/mL)

$$\mathbf{N = \text{média do nº de colónias contadas} \times \text{inverso da diluição}}$$

Determinação do Número Mais Provável de Coliformes

Material

- Tubo ou frasco com a amostra
- Tubos para diluições com 9 ml de solução de Ringer (SR)
- Tubos com meio de Verde Brilhante e tubo de Durham (12 por grupo)
- Micropipeta e pontas esterilizadas

Protocolo experimental

1. Preparar diluições crescentes da amostra em SR nos tubos distribuídos, na razão 1:10, até à diluição 10^{-3} .
 - 9 ml de SR + 1 ml da amostra = Volume total de 10 ml
2. Identificar os tubos
 - - Identificação do grupo
 - - Referir a diluição a inocular
 - - Fazer três tubos para cada diluição
3. Semear o leite e as 3 diluições no meio fornecido:
 - Deitar 1 ml da amostra em cada um de três tubos
 - Repetir para cada diluição
4. Incubar a 37 °C durante 24h.
6. Observar os tubos e ver, para cada diluição, quantos tubos estão positivos. Interpretar os resultados de acordo com a tabela.

Tubos positivos – turvação e gás no tubo de Durham

Apresentar o resultado de acordo com a tabela.

Tubos positivos			NMP/mL
0,10 mL	0,01 mL	0,001 mL	
0	0	0	<3.0
0	0	1	3.0
0	1	0	3.0
0	1	1	6.1
0	2	0	6.2
0	3	0	9.4
1	0	0	3.6
1	0	1	7.2
1	0	2	11
1	1	0	7.4
1	1	1	11
1	2	0	11
1	2	1	15
1	3	0	16
2	0	0	9.2
2	0	1	14
2	0	2	20
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	3	0	29
2	3	1	36
3	0	0	23
3	0	1	38
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, T. A. (2016). *Gene Cloning and DNA Analysis: an Introduction*, 7th Edition. Wiley-Blackwell.
2. Canas Ferreira, W. F., Sousa, J. C. F., Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lidel.
3. Carter, G. R., Wise, D. J. (2003). *Essentials of Veterinary Microbiology and Mycology*, 6th Edition. Wiley Publishers.
4. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Edition. Pearson.
5. Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. (1998). *Microbiology – Concepts and Applications*. 5th Edition. McGraw-Hill.
6. Videira, A. (2011). *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações*, 2^a Edição. Lidel.
7. Willey, J., Sherwood, L. and Woolverton, C. J. (2017). *Prescott's Microbiology*, 10th Edition. WCB – McGraw-Hill Publishers.