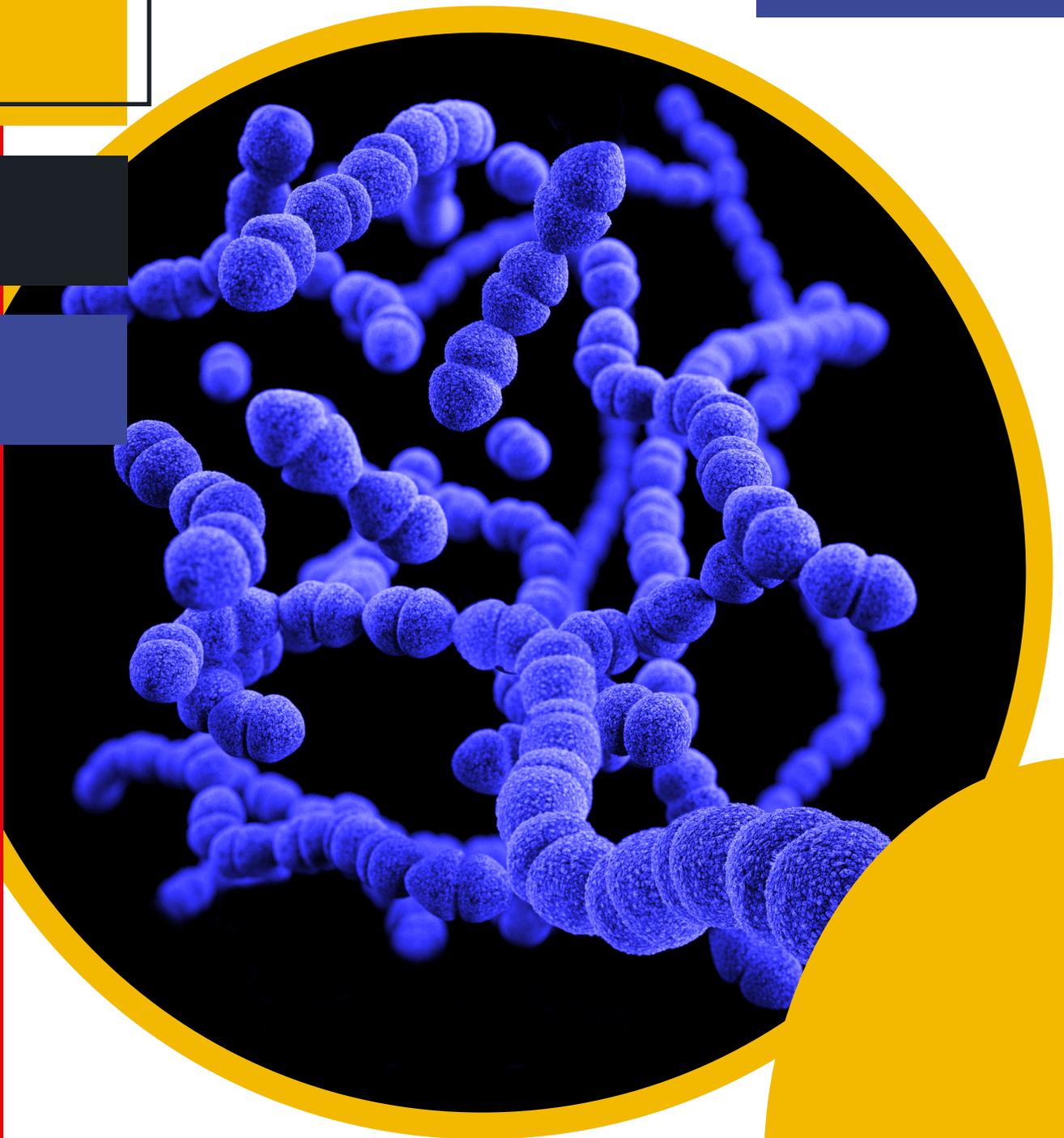


Manual de **Microbiologia**



CENTRO UNIVERSITÁRIO
SÃO CAMILO

© Copyright 2023. Centro Universitário São Camilo.
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS.

Manual de Microbiologia

Centro Universitário São Camilo

João Batista Gomes de Lima - Reitor

Francisco de Lélis Maciel - Vice-reitor e Pró-reitor Administrativo

Carlos Ferrara Junior - Pró-reitor Acadêmico

Organizadora

Tânia Leiko Tanaka

Autores:

Marina Teixeira Rosalem

Ana Beatriz Avelino Lourenço

Produção editorial – Setor de Publicações

Bruna San Gregório

Cintia Machado dos Santos

Bruna Diseró

Rodrigo de Souza Rodrigues

Este material foi construído de forma colaborativa pelas alunas do curso de graduação do Centro Universitário São Camilo que participaram do programa de monitoria em Microbiologia oferecido pelo Eixo Institucional.

M251

Tanaka, Tânia Leiko

Manual de microbiologia / Tânia Leiko Tanaka, Marina Teixeira Rosalem, Ana Beatriz Avelino Lourenço. -- São Paulo: Setor de Publicações - Centro Universitário São Camilo, 2023.

37 p.

ISBN 978-65-86702-42-2

1. Bacteriologia 2. Cultivo bacteriano 3. Crescimento bacteriano
4. Coloração de Gram I. Rosalem, Marina Teixeira II. Lourenço,
Ana Beatriz Avelino III. Título

CDD: 576

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Lucia Pitta - CRB 8/9316



SUMÁRIO

NORMAS DOS LABORATÓRIOS.....	4
Capítulo 1 MICROSCOPIA.....	5
Capítulo 2 MORFOLOGIA DOS VÍRUS.....	6
Capítulo 3 MORFOLOGIA DAS BACTÉRIAS.....	7
Capítulo 4 MORFOLOGIA DOS FUNGOS.....	11
Capítulo 5 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO.....	12
Capítulo 6 MEIOS DE CULTURA.....	14
Capítulo 7 CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	22
Capítulo 8 DIFICULDADES DO CULTIVO DE VÍRUS EM LABORATÓRIO.....	25
Capítulo 9 MINIATLAS: IMAGENS DE BACTERIOSCOPIA.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

NORMAS DOS LABORATÓRIOS

Vestimentas

Calças longas e sapatos fechados. Cabelos longos devem estar presos.

Avental

O uso de avental branco, longo e de manga comprida é obrigatório nas aulas práticas nos laboratórios.

Organização do ambiente

Mantenha o ambiente limpo e organizado, outros alunos também terão aula no mesmo laboratório.

Cuidado e atenção com o equipamento

- **Tenha cuidado durante o manejo do microscópio óptico;**
- **Antes de ligar o microscópio na tomada, verifique se o potenciômetro da lâmpada está no mínimo, pois se não estiver, poderá queimar a lâmpada;**
- **Tome cuidado para que a lente objetiva não raspe na lâmina durante o ajuste da platina (mesa);**
- **Sempre inicie as observações pela lente objetiva de menor aumento (4x);**
- **Coloque e fixe a lâmina com a presilha antes de subir a platina para não bater e quebrar as estruturas próximas.**

Normas Gerais

**Não é permitido comer, beber, fumar e falar ao celular durante as aulas.
Recomenda-se lavar as mãos antes e após a aula prática.**

MICROSCOPIA

Componentes mecânicos do microscópio:

1. Pé ou base: apoio aos demais componentes.
2. Braço: fixa-se na base, suporte para as lentes e a platina.
3. Tubo ou Canhão: suporte das lentes oculares, ajustado de acordo com a distância entre os olhos do visualizador.
4. Revólver: suporte das lentes objetivas, sua rotação permite selecionar a lente objetiva desejada.
5. Platina ou mesa: possui abertura central, local onde coloca-se a lâmina, permite a passagem de luz e a transferência de imagem, a pinça metálica, localizada na parte traseira da mesa, auxilia a fixar a lâmina contendo o material a ser observado.
6. Lâmina: preparação onde encontram-se as estruturas a serem visualizadas (não ilustrado).
7. Parafuso micrométrico: realiza os movimentos verticais da platina de pequena amplitude para se obter um melhor foco da imagem.
8. Parafuso macrométrico: realiza os movimentos verticais da platina de grande amplitude.
9. Diafragma: controla a passagem de luz.

Componentes ópticos do microscópio:

10. Fonte luminosa: luz artificial emitida pela lâmpada com um interruptor e um reostato que regulam sua intensidade.
11. Condensador: sistema de duas ou mais lentes convergentes que distribuem e orientam a luz emitida pela fonte luminosa para o campo de visão.
12. Lente ocular: local na extremidade superior, através dela se observa a imagem aumentada. O aumento da imagem pela lente ocular é direto e virtual. Exemplo: 5, 8 ou 10 vezes de aumento.
13. Lente objetiva: Conjunto de lentes localizadas no revólver, permitindo a ampliação diferenciada da imagem. As lentes são identificadas por faixas coloridas: a lente de aumento de 4 vezes é vermelha, 10 vezes é amarela, 40 vezes é azul e 100 vezes é branca (necessário óleo de imersão).

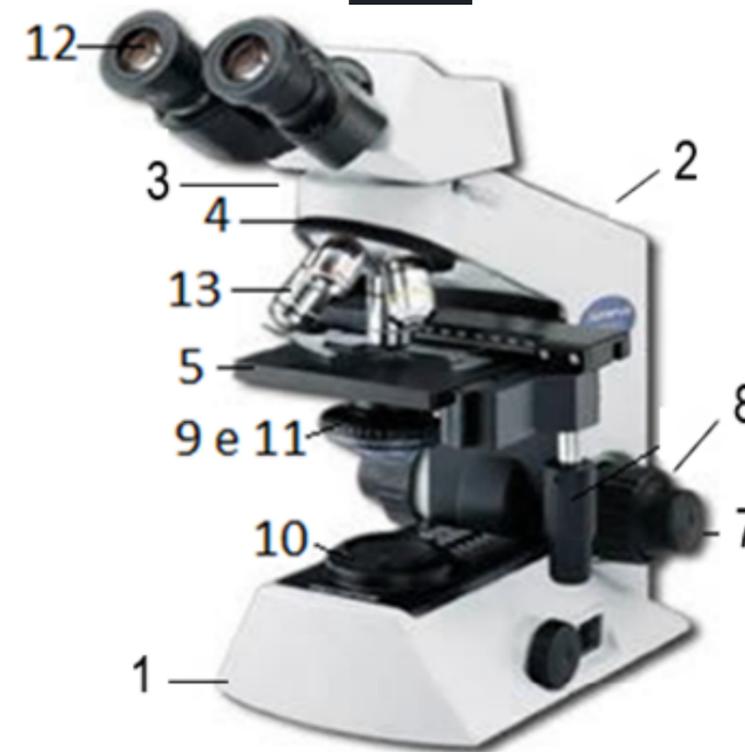


Figura 1 Microscópio Olympus Laboratory Microscopes.



Observação: Para acessar o vídeo gravado pelas monitoras sobre o uso de microscópio, utilize o QR Code acima.

Óleo de imersão: uma gota desse óleo mineral age como uma interface entre o objeto a ser visualizado e a lente, melhorando a qualidade da imagem.

MORFOLOGIA DOS VÍRUS

São microrganismos acelulares e intracelulares obrigatórios, visualizados apenas em microscopia eletrônica por terem dimensões nanométricas.

Bacteriófagos

Vírus que infectam bactérias são chamados bacteriófagos ou fagos, estão esquematizados abaixo.

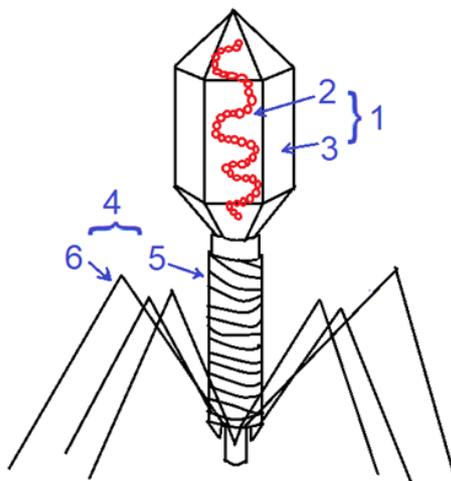


Figura 2 - Ilustração de um bacteriófago. Fonte: próprios autores.

- 1 - Cabeça
- 2 - Ácido nucleico (material genético)
- 3 - Capsídeo (proteína)
- 4 - Cauda
- 5 - Bainha contrátil
- 6 - Fibra proteica

- 1 - Ácido nucleico (material genético)
- 2 - Capsídeo (proteína)
- 3 - Capsômeros
- 4 - Envelope (lipídico)
- 5 - Espículas (proteínas acessórias)

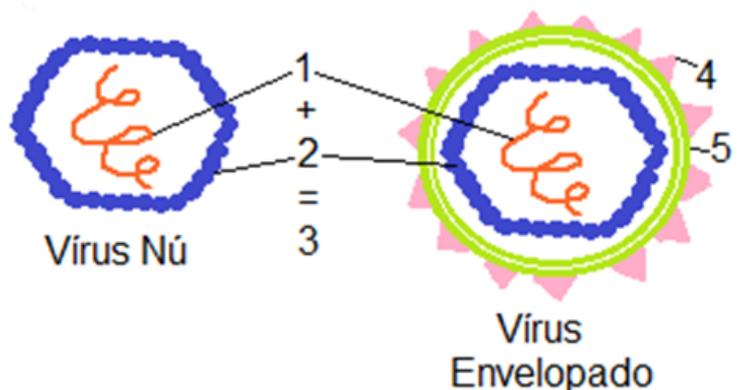


Figura 3 - Ilustração de vírus de células animais. Fonte: próprios autores.

MORFOLOGIA DAS BACTÉRIAS

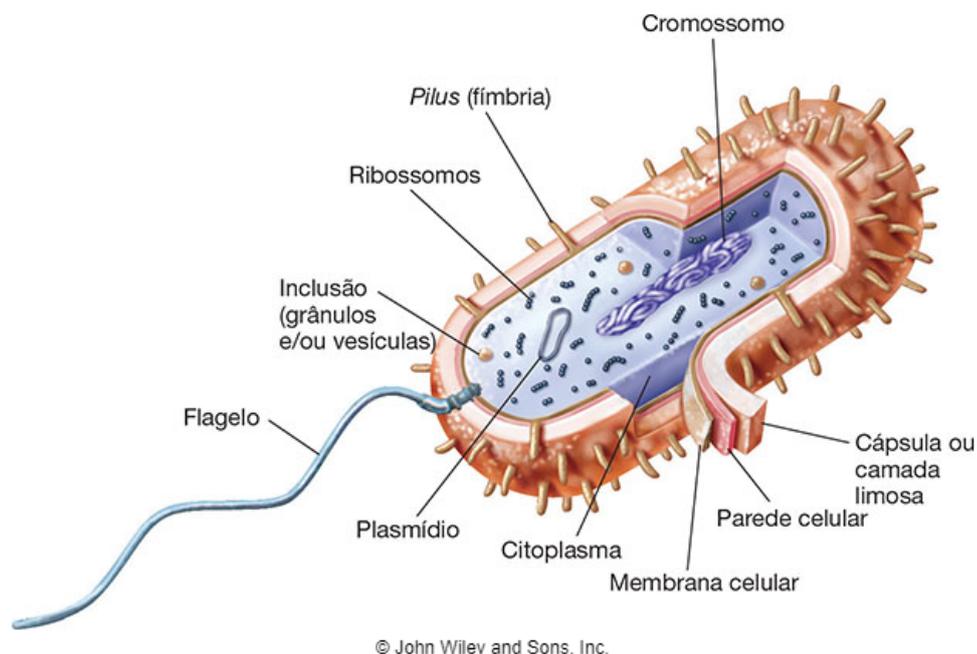


Figura 4 - Ilustração dos componentes bacterianos.
Fonte: BLACK & BLACK, 2021.

Estruturas fundamentais: essenciais para a sobrevivência da célula bacteriana.

- Parede celular: protege contra a entrada excessiva de água, confere resistência e rigidez, além de manter a morfologia bacteriana.
- Membrana celular: controla a entrada e saída de substâncias.
- Citoplasma: função de sustentação celular, local das reações metabólicas bacterianas.
- Cromossomo (nucleoide): local onde se encontra a informação genética da célula.
- Ribossomos: responsáveis pela síntese proteica.

Estruturas acessórias: auxiliam no prolongamento da vida bacteriana.

- Plasmídeos: DNA extracromossômico.

- Pilus (Fímbria): aderência (tipo 1) e de conjugação (sexual) - não ilustrado.
- Flagelo: mobilidade da bactéria.
- Glicocálice/Cápsula: inibe a fagocitose pelos macrófagos e a ação do sistema complemento.
- Endósporo: garante resistência atemporal em períodos de estresse - não ilustrado.
- Grânulos de inclusão: contêm substâncias específicas, como o glicogênio e o polifosfato, respectivamente. Auxiliam na obtenção de energia e fornecem fosfato para variados processos metabólicos.

Formas e Arranjos bacterianos

- Cocos: diplococos, estreptococos, tétrades, sarcinas e estafilococos.
- Bacilos: bacilo único, diplobacilos, estreptobacilos e cocobacilos.

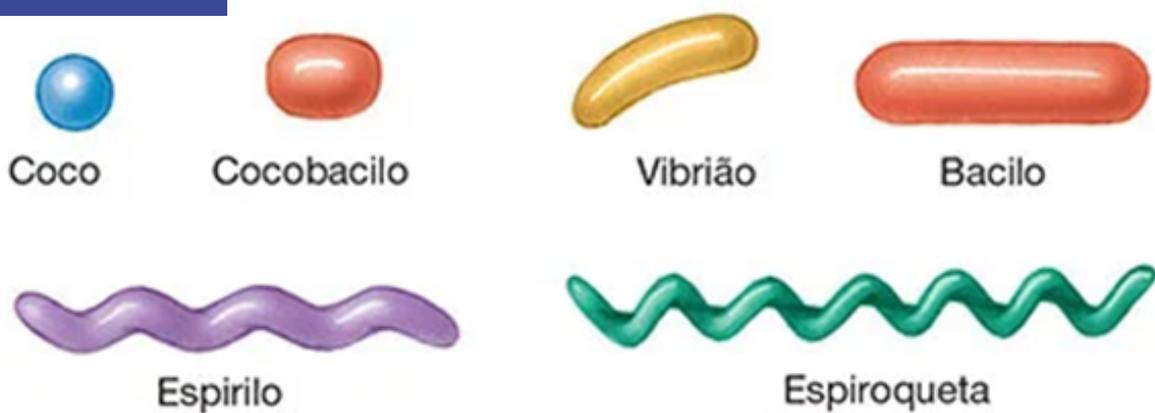


Figura 5 - Formatos bacterianos básicos. Fonte: BLACK & BLACK, 2021.

Outros: bactérias em diferentes formatos.

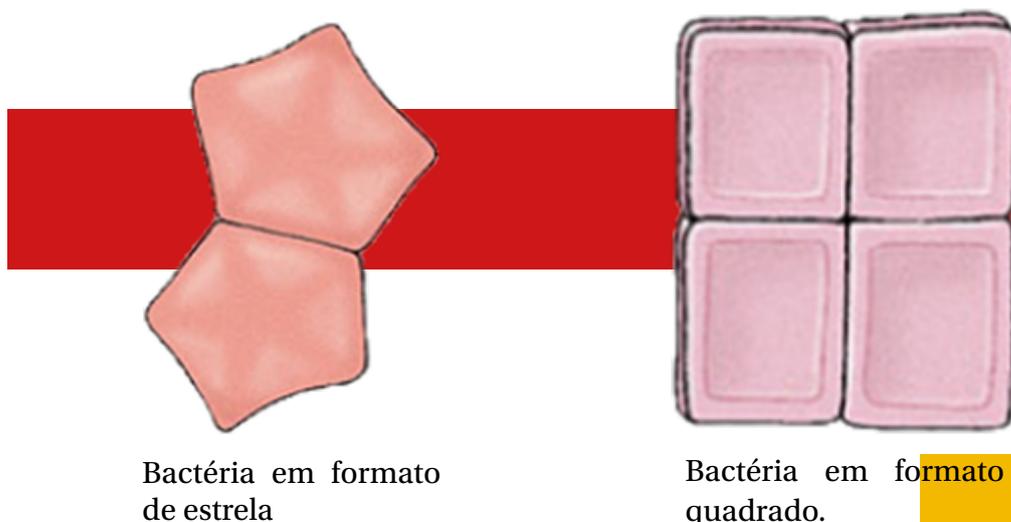


Figura 6 - Outros formatos bacterianos. Fonte: BLACK & BLACK, 2021.

Tempo de geração

Representa o tempo necessário de divisão celular considerado na reprodução bacteriana por divisão binária para que sejam originadas duas bactérias.

Número de gerações	Número de células	Log ₁₀ do número de células
0	2 ⁰ = 1	0
5	2 ⁵ = 32	1,51
10	2 ¹⁰ = 1.024	3,01
15	2 ¹⁵ = 32.768	4,52
16	2 ¹⁶ = 65.536	4,82
17	2 ¹⁷ = 131.072	5,12
18	2 ¹⁸ = 262.144	5,42
19	2 ¹⁹ = 524.288	5,72
20	2 ²⁰ = 1.048.576	6,02

Tabela 1 - Tempo de geração bacteriana. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Fases de crescimento bacteriano em sistema fechado

Bactérias quando inoculadas em meio líquido de crescimento em sistema fechado podem ter seu crescimento representado graficamente na curva de crescimento microbiano, que correlaciona o tempo com o crescimento bacteriano, como ilustrado abaixo.

- Fase lag: período de pouca ou nenhuma divisão bacteriana, em conjunto a intensa atividade metabólica, pode durar de horas a dias.
- Fase log (exponencial): período de aumento da divisão bacteriana, com geração constante.
- Fase estacionária: interrupção do crescimento exponencial e estabilização da reprodução bacteriana.
- Fase de morte celular: declínio logarítmico, cessa a divisão bacteriana, o número de células mortas excede o número de novas células.

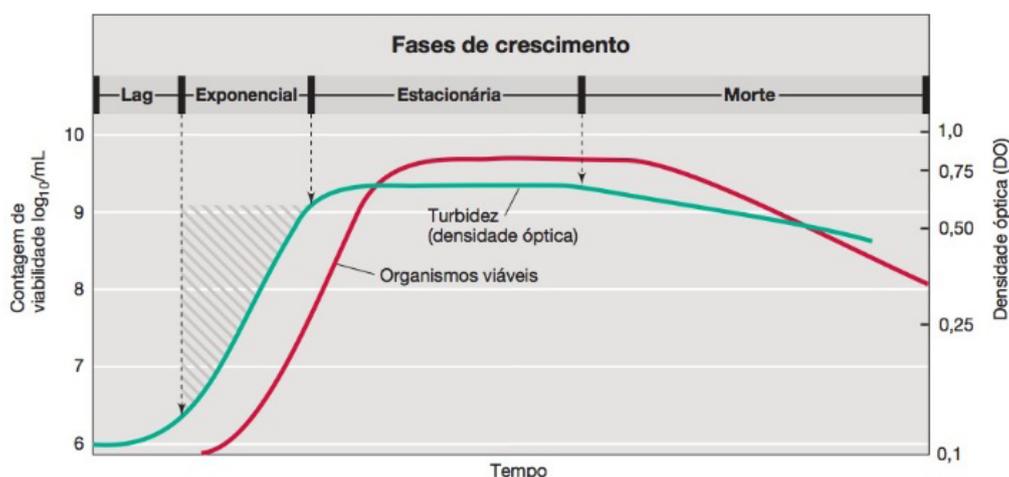


Figura 7 - Fases de crescimento bacteriano em sistema fechado. Fonte: MADIGAN, MARTINKO, BENDER, 2016.

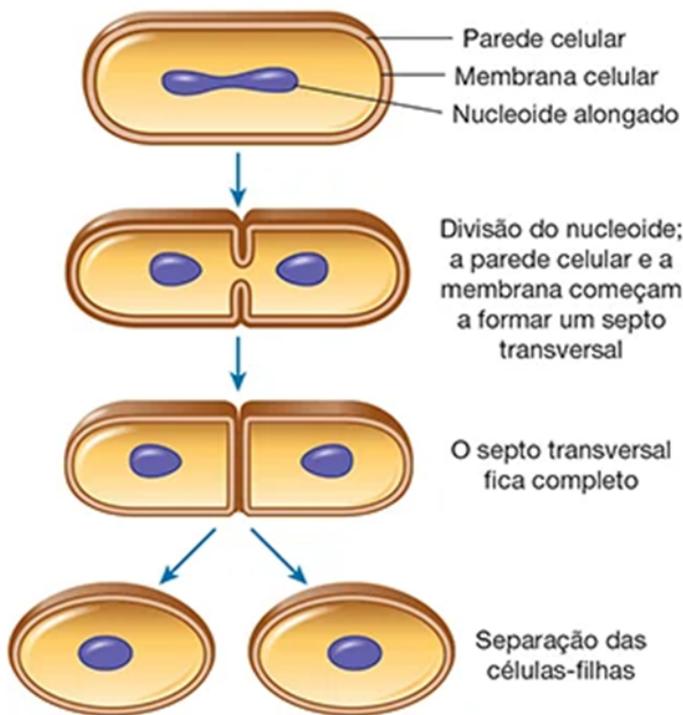


Figura 8 - Reprodução bacteriana. Fonte: BLACK & BLACK, 2021.

Reprodução bacteriana

As bactérias reproduzem-se por divisão binária simples, conforme ilustrado na figura 9, mas podem ganhar genes de outros micróbios por recombinação genética, via transformação, transdução e conjugação.

- Transformação: incorporação de DNA livre após a citólise de uma célula.
- Transdução: o bacteriófago transfere à bactéria DNA viral que passa para o genoma bacteriano.
- Conjugação: transferência de plasmídeos entre uma bactéria doadora e outra receptora, através da fímbria F.

Na figura ao lado, observamos o resumo das diferentes formas de recombinação genética bacteriana: transformação, transdução e conjugação.

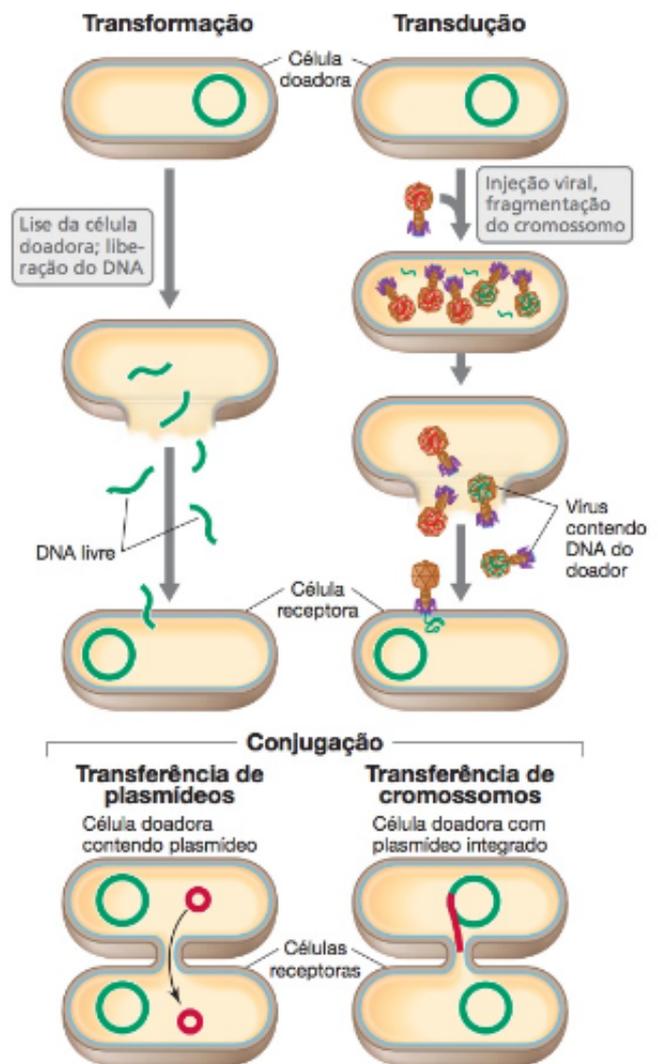


Figura 9 - Formas de recombinação genética bacteriana. Fonte: MADIGAN, MARTINKO, BENDER, 2016.

MORFOLOGIA DOS FUNGOS

Bolores

São fungos pluricelulares, eucarióticos, constituídos por um conjunto de hifas, também conhecido por micélio. São filamentosos e possuem parede celular composta por quitina, podem apresentar hifas septadas e asseptadas.

- Reprodução sexuada: por meio de gametas.
- Assexuada: por brotamento, gemulação ou cissiparidade.

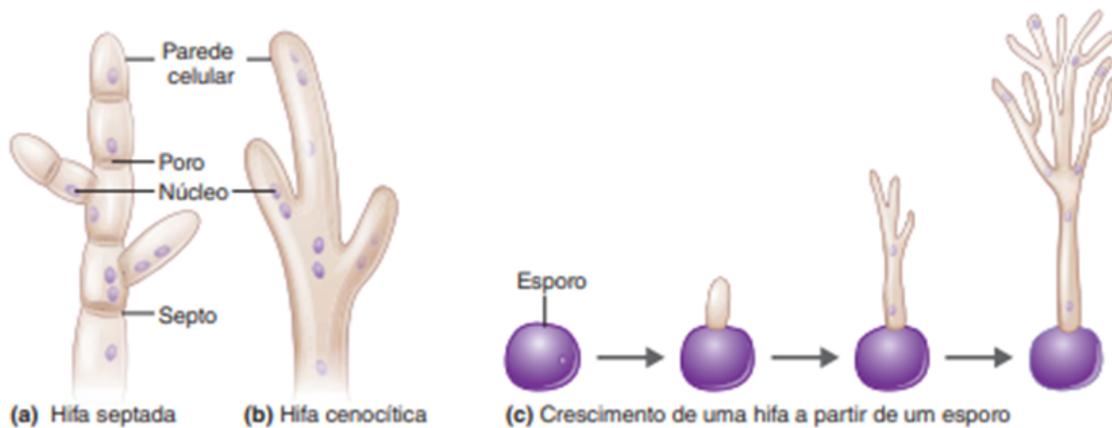


Figura 10 - Ilustração de hifas em (a) septadas e em (b) cenocíticas. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

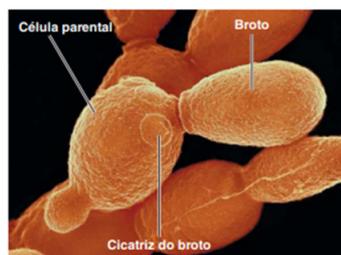
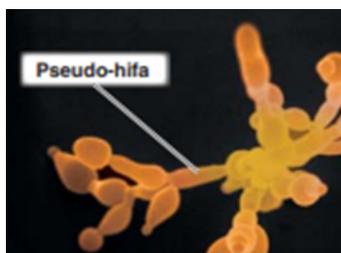


Figura 11 - Ilustração de leveduras. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Leveduras

São fungos unicelulares, apresentam características de seres eucarióticos, aspecto ovalado, membrana celular com parede rígida composta por quitina e citoplasma com material de reserva.

Curiosidades:

- 1 - Esporos diferenciam-se de gametas;
- 2 - Membrana celular é composta por glicanos, mananas e quitina;
- 3 - Leveduras são unidas por glicocálice;
- 4 - Fungos no geral são maiores do que as bactérias.

TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

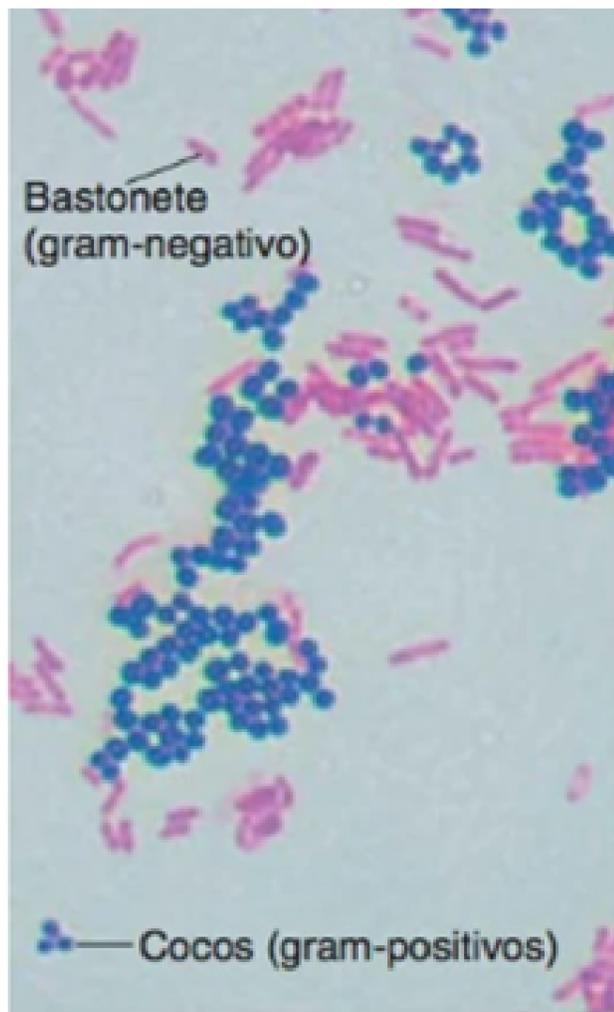
Os corantes resumem-se em sais compostos por íons positivos e negativos.

Podem ser corantes básicos atraídos por bactérias Gram-negativas ou corantes ácidos atraídos por bactérias Gram-positivas.

- Corantes básicos: cristal violeta, azul de metileno, verde de malaquita e safranina.
- Coloração simples: solução aquosa ou alcoólica de um corante básico com objetivo de destacar a estrutura celular do microrganismo.
- Mordente: aumenta a afinidade da coloração pela amostra biológica e reveste as estruturas, a fim de facilitar a observação.
- Coloração diferencial: reage com diversos tipos de bactérias e utilizada para distingui-las. P. ex., coloração de Gram e coloração álcool-ácido resistente.

“A coloração é aplicada ao esfregaço fixado por um determinado período de tempo e então lavada; a lâmina é seca e examinada. Algumas vezes, uma substância química é adicionada à solução para intensificar a coloração; este aditivo é denominado mordente” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

- Coloração de Gram: tem por objetivo diferenciar as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas.



(b)

LM 5 μm

Passo a passo: Coloração de Gram

- 1 - O esfregaço fixado em calor é coberto com um corante básico púrpura, geralmente cristal violeta. Colorindo-se todas as células, denominada coloração primária.
- 2 - Após curto período, o corante púrpura é lavado e recobre-se o esfregaço com iodo. Quando o iodo é lavado, ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aparecem em cor violeta escuro ou púrpura.
- 3 - A seguir, a lâmina é lavada com álcool ou com uma solução álcool-acetona, sendo um agente decolorante que remove a coloração púrpura das células de algumas espécies específicas de bactérias.
- 4 - O álcool é lavado, e a lâmina é então corada com safranina, um corante básico vermelho.
- 5 - O esfregaço é lavado novamente, seco com papel e examinado microscopicamente.

Figura 13 - Bactérias coradas pela técnica de Gram. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

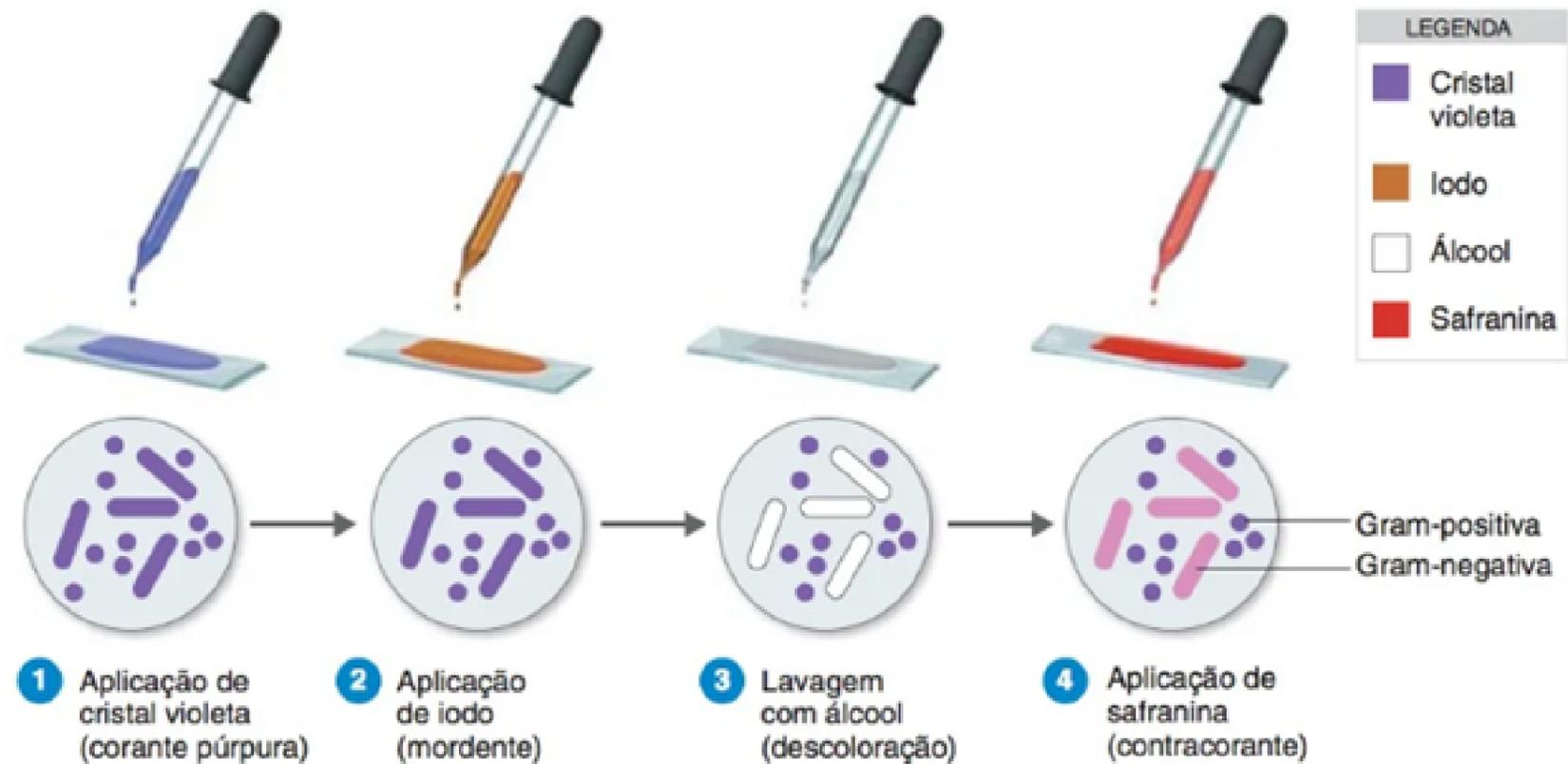


Figura 12 - Etapas da Coloração de Gram. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Observação: Para acessar o vídeo gravado pelas monitoras sobre a coloração de Gram, acesse o QR Code abaixo.



QR Code - Esfregaço e coloração de gram.

MEIOS DE CULTURA

Preparações contendo nutrientes utilizados para o crescimento de microrganismos, bactérias e fungos.

- **Inóculo:** corresponde aos microrganismos que são introduzidos no meio de cultura para dar início ao crescimento microbiano.
- **Cultura:** microrganismos que crescem e se multiplicam no interior ou sob o meio de cultura.
- **Colônias:** conjuntos de microrganismos de uma mesma espécie, unidos entre si para formar uma unidade estrutural e funcional.

ÁGAR

Agente solidificante, adicionado ao meio sólido.

Para que ocorra o crescimento microbiano, o meio de cultura deve fornecer energia, fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros fatores orgânicos não sintetizados pelos microrganismos.

- **Meio quimicamente definido:** a composição química exata é conhecida, contendo fatores de crescimento orgânico que atuam como fonte de carbono e energia. Ex: glicose, aminoácidos, sais e vitaminas.
- **Meio complexo:** meio no qual as necessidades de carbono, energia, enxofre e nitrogênio são fornecidas essencialmente por proteínas, contendo extratos vegetais, de carne, de leveduras ou de plantas, sendo dessa maneira elaborados. Ex: ágar nutriente.

- Meios seletivos: não permitem o crescimento de um certo grupo de microrganismos (indesejados), pois são incluídas substâncias que impedem o crescimento deles e favorecem o crescimento dos microrganismos de interesse. Ex: ágar sulfito de bismuto e ágar Sabouraud dextrose.
- Meio diferencial: estes facilitam a diferenciação de colônias do microrganismo de interesse de outras colônias de variados microrganismos em crescimento na mesma placa. Ex: ágar sangue.

As características seletivas e diferenciais podem combinar-se em um mesmo meio. Ex: ágar hipertônico manitol, ágar MacConkey, ágar CLED e ágar SPS.

“Meios seletivos são utilizados para o isolamento de organismos específicos que podem estar presentes junto com outros organismos (p.ex., um patógeno entérico nas fezes)” (MURRAY, 2017).

- Meio de enriquecimento: utilizado para enriquecer um meio de cultura, através de nutrientes e condições ambientais favoráveis, voltadas para os microrganismos de interesse. Ex: fenol usado em uma amostra de solo com bactérias presentes em menor número, capazes de metabolizá-lo e de multiplicar-se por meio deste. Também podem ser ágar sangue e ágar chocolate.

Meio de cultura

Tipo	Finalidade
Quimicamente definido	Crescimento de quimioautotróficos e fotoautotróficos; ensaios microbiológicos.
Complexo	Crescimento da maioria dos organismos quimio-heterotróficos.
Redutor	Crescimento de anaeróbios obrigatórios.
Seletivo	Supressão de microrganismos indesejados; favorecimento dos microrganismos de interesse.
Diferencial	Diferenciação das colônias dos microrganismos de interesse em relação aos outros.
Enriquecimento	Similar ao meio seletivo, mas elaborado para aumentar o número de microrganismos de interesse até níveis detectáveis.

Quadro 1 - Meios de Cultura e finalidades. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Meios de cultura mais comumente utilizados

Ágar nutriente



Figura 14 - Colônias bacterianas em ágar nutriente. Fonte: SALVATIERRA, 2014.

Rotineiramente, em sua maioria, os laboratórios utilizam meios que contêm peptona de carne de vaca ou peixe em caldo nutriente ou meio ágar sólido. Sendo a peptona produto da digestão enzimática de proteínas, fornecendo peptídeos que serão utilizados pelos microrganismos.

Esses meios podem ser enriquecidos com extratos de leveduras (rico em vitaminas, coenzimas e nucleosídeos) ou hidrolisado de caseína, advindo da

proteína do leite (rico em aminoácido).

Sua aplicabilidade resume-se na análise de água, alimentos e leite, servindo como um meio de cultura prévio de amostras submetidas a testes bacteriológicos, e também para o isolamento de culturas puras.

Como as colônias são observadas nesse meio?

Compostas por uma grande diversidade de microrganismos pouco exigentes, formando aglomerados em formato arredondado, como observado na parte central da imagem abaixo.

Ágar sangue

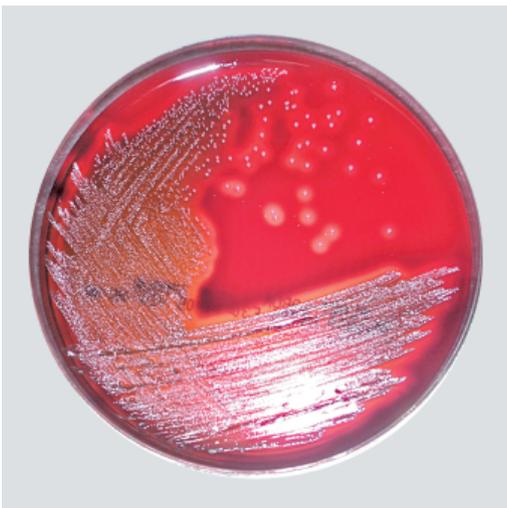


Figura 15 - Colônias bacterianas hemolíticas em ágar sangue. Fonte: VERMELHO, 2019.

Utilizado na identificação dos microrganismos causadores de hemólise e/ou degradação dos eritrócitos, proporcionando o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como os fungos. Contendo em seu soro, sangue total e sangue total aquecido, diversos nutrientes para os patógenos, sendo assim, útil para o enriquecimento dos meios de cultura.

- Contêm dois componentes primários: um meio básico (p.ex., soja tríptica, infusão de cérebro e coração, base Brucella) e o sangue (p.ex., de ovelha, cavalo ou coelho).

Como as colônias se apresentam nesse meio?

Podem ser compostas por bactérias hemolíticas, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, ou por bactérias não-hemolíticas. Note na parte central da imagem abaixo que ao redor das colônias há uma área clara correspondente ao local onde houve hemólise.

Ágar chocolate



Figura 16 - Colônias bacterianas em meio de ágar chocolate. Fonte: MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016.

Também contém hemácias, entretanto, é considerado mais enriquecido do que o ágar sangue, pois a hemoglobina está mais acessível. Consistindo em um ágar sangue modificado, pois a hemácia quando adicionada ao meio aquecido é rompida, liberando a hemoglobina e o meio torna-se de tom marrom.

Como as colônias se apresentam nesse meio?

Esse meio é mais utilizado para o cultivo de bactérias patogênicas fastidiosas (exigentes) que não crescem em ágar sangue, por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae*.

- Tipos de ágar chocolate: ágar Thayer-Martin e ágar Martin-Lewis.

Ágar Sabouraud dextrose



Figura 17 - Cultivo de bolores em ágar Sabouraud. Fonte: SALVATIERRA, 2014.

Como as colônias se apresentam nesse meio?

O menor pH e a adição de antibióticos são aplicados a fim de inibir o crescimento de bactérias, tornando esse meio seletivo para os fungos. Ainda, deve-se tomar cuidado ao cultivo de fungos em laboratório, visto que alguns esporos são altamente infecciosos.

Ágar Manitol

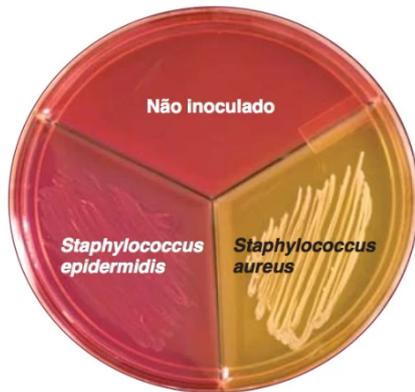


Figura 18 - Staphylococcus em meio de ágar manitol. Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

É um meio seletivo para estafilococos e diferencial para *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, o meio contém caseína digerida e tecido animal, extrato de carne, manitol, sais e vermelho fenol. Ressaltando-se que os estafilococos são capazes de desenvolver-se em meios mais concentrados com sal, e os *Staphylococcus aureus* podem fermentar o manitol.

Como as colônias se apresentam nesse meio?

Bactérias aptas a se desenvolverem em concentrações de cloreto de sódio em 7,5% crescerão nesse meio, ou seja, o sal pode impedir o crescimento da maioria das bactérias, exceto das espécies de *Staphylococcus spp.*

As bactérias *S. aureus* capazes de fermentar o manitol, apresentam colônias amareladas e as bactérias de outras espécies de *Staphylococcus* são incapazes de fermentar o manitol e apresentam colônias incolores.

Ágar MacConkey



Figura 19 - Bactérias Gram-negativas cultivadas em ágar MacConkey. Fonte: VERMELHO, 2019.

Meio seletivo e diferencial, contém cristal violeta e sais biliares, assim como açúcar lactose e um indicador de pH, esse último torna as colônias fermentadoras da lactose na cor vermelha e as colônias não fermentadoras da lactose incolores ou translúcidas. Além disso, ele inibe o crescimento das bactérias Gram-positivas e permite o crescimento das Gram-negativas.

Como as colônias são observadas nesse meio?

Normalmente caracterizadas pelas enterobactérias, encontradas no intestino humano que, por sua maioria, fermentam a lactose e apresentam colônias maiores de 1 mm de diâmetro após incubação de 18 a 24 horas, possuindo aspecto opaco, brilhante, transparente ou mucoide.

- Bactérias produtoras de ácidos fortes, como a *Escherichia coli*, formam colônias em vermelho-escuro;
- Bactérias produtoras de ácidos fracos, formam colônias em rosa-pálido ou claras na periferia e com o centro mais rosado.

Ágar Mueller-Hinton

Meio empregado em testes de rotina de suscetibilidade bacteriana aos antibióticos (antibiograma). Composto por extratos de caseína e carne, sais, cátions divalentes e amido solúvel essencial para a reprodutibilidade dos resultados.

Como as colônias são observadas nesse meio?

Pode ser realizado pela técnica de Kirby/Bauer (difusão), este resume-se na dispersão, no meio de Ágar Mueller-Hinton, de substâncias antimicrobianas que são embebidas em discos de papel-filtro e dispensadas sobre a placa. Assim, as colônias bacterianas podem ser classificadas como:

- Resistente: o microrganismo apresenta resistência ao antimicrobiano, sendo nesse caso comprometida a eficácia do fármaco.
- Intermediária: o microrganismo apresenta resistência intermediária ao antibiótico, a eficácia do fármaco coloca-se sob suspeita.
- Sensível dose-dependente: o microrganismo apresenta sensibilidade ao antimicrobiano, nesse caso apenas quando ocorre exposição a altas dosagens da droga.
- Sensível: o microrganismo é suscetível ao antibiótico colocado no disco, tornando-se assim recomendado o uso deste fármaco para o combate da patologia analisada. Esse resultado é notado caso não haja o crescimento do microrganismo próximo ao antibiótico, sendo a medida do halo de inibição acima do prescrito para a droga aplicada.

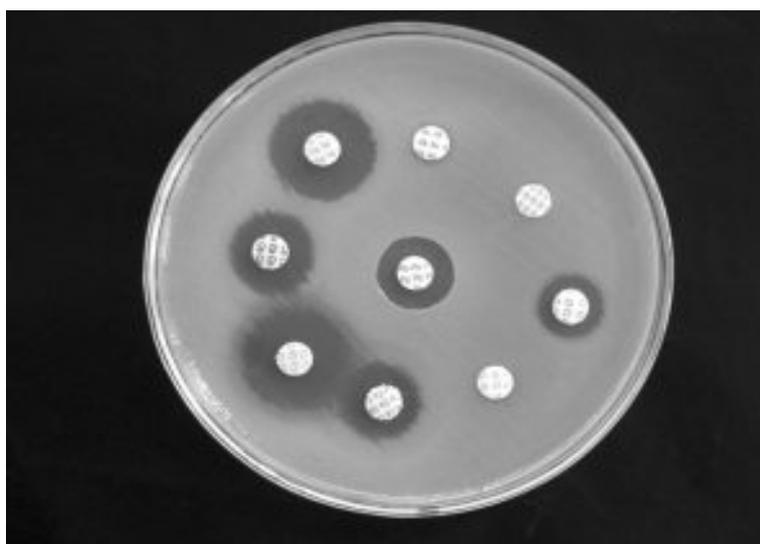


Figura 20 - Antibiograma pelo método de difusão. Note que ao redor de alguns discos de antibióticos há diferentes diâmetros ao redor dos halos de inibição do crescimento bacteriano. Fonte: UEM, 2006.

No quadro abaixo há aplicações, exemplos e finalidade de alguns meios de cultura comumente utilizados na prática clínica de microbiologia.

Quadro 2 - Classificação dos meios de culturas.

Tipo	Meios (exemplos)	Finalidade
Não seletivos	Ágar sangue	Isolamento de bactérias e fungos
	Ágar chocolate	Isolamento de bactérias, incluindo <i>Haemophilus</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Ágar Mueller-Hinton	Meio para teste de suscetibilidade bacteriana
	Caldo tioglicolato	Caldo enriquecido para bactérias aeróbicas
	Ágar Sabouraud dextrose	Recuperação de fungos
Seletivos e/ou diferenciais	Ágar MacConkey	Seletivo para bactérias Gram-negativas; Diferencial para espécies fermentadoras da lactose
	Ágar manitol	Seletivo para estafilococos; diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i>
	Ágar xilose-lisina desoxicolato	Ágar seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> em culturas entéricas
	Meio de Lowenstein-Jensen	Seletivo para micobactérias
	Ágar Middlebrook	Seletivo para micobactérias
	CHROMagar	Seletivo e diferencial para bactérias e leveduras selecionadas
	Ágar inibidor de fungos filamentosos	Seletivo para fungos filamentosos

Continua...

...Continuação

Tipo	Meios (exemplos)	Finalidade
Especializados	Ágar extrato de levedura em carvão tamponado (BCYE)	Recuperação de <i>Legionellae</i> e <i>Nocardia</i>
	Ágar cistina-telurito	Recuperação de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
	Caldo Lim	Recuperação de <i>Escherichia coli</i> O157
	Ágar MacConkey sorbitol	Recuperação de <i>Escherichia coli</i> O157
	Ágar Regan-Lowe	Recuperação de <i>Bordetella pertussis</i>
	Ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS)	Recuperação de espécies de <i>Vibrio</i>

Fonte: Adaptado de MURRAY, 2017.

CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano é o aumento no número celular, logo, o controle do crescimento é a diminuição ou aniquilação desses microrganismos, que poderá ser realizado por diversas formas ilustradas no quadro a seguir. Alguns termos importantes e de uso corrente para o controle de crescimento microbiano serão apresentados abaixo:

Esterilização: remoção de todos os microrganismos vivos.

Desinfecção: destruição de microrganismos patogênicos em objetos.

Antissepsia: destruição de microrganismos patogênicos em tecidos vivos.

Sanitização: reduz micróbios nos utensílios a níveis seguros de saúde pública.

Degerminação: remoção de microrganismos de uma área específica do corpo.

Quadro 3 - Métodos físicos utilizados no controle do crescimento microbiano.

Métodos físicos utilizados no controle do crescimento microbiano	Mecanismo de ação	Aplicações
Fervura ou passagem de vapor	Desnaturação de proteínas	Preparo de alimentos; Desinfecção de água
Autoclave	Desnaturação de proteínas	Esterilização de utensílios médicos resistentes ao calor
Pasteurização	Desnaturação de proteínas	Remoção de microrganismos patogênicos do leite e sucos de frutas
Chama direta	Queimar até se tornarem cinzas	Esterilização da alça bacteriológica
Incineração	Queimar até se tornarem cinzas	Descarte de material hospitalar
Esterilização com calor a alta temperatura	Oxidação	Vidros vazios, instrumentos, agulhas e seringas
Filtração	Ágar manitol	Seletivo para estafilococos; diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i>
Refrigeração	Ágar xilose-lisina desoxicolato	Ágar seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> em culturas entéricas
Ultracongelamento	Meio de Lowenstein-Jensen	Seletivo para micobactérias
Liofilização	Ágar Middlebrook	Seletivo para micobactérias
Alta pressão	CHROMagar	Seletivo e diferencial para bactérias e leveduras selecionadas
Dessecação	Ágar inibidor de fungos filamentosos	Seletivo para fungos filamentosos
Pressão osmótica	Plasmólise	Conservação de alimentos.
Radiação Ionizante	Destruição do material genético	Esterilização de produtos cirúrgicos sensíveis ao calor
Radiação não ionizante	Danos no material genético	Controle de ambientes fechados com lâmpada UV

Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

Quadro 4 - Agentes químicos utilizados no controle do crescimento microbiano.

Agentes químicos utilizados no controle do crescimento microbiano	Mecanismo de ação	Exemplos de aplicabilidade
Fenol	Ruptura da membrana plasmática, desnaturação das enzimas	Desinfetante
Compostos fenólicos	Ruptura da membrana plasmática, desnaturação das enzimas	Instrumentos, superfícies cutâneas e membranas mucosas
Bisfenóis	Ruptura da membrana plasmática	Sabonetes para antissepsiadas mãos
Biguanidas	Ruptura da membrana plasmática.	Antissepsia da pele.
Halogênicos	O iodo inibe a função das proteínas e é um forte agente oxidante; O cloro forma o agente oxidante forte (ácido hipocloroso), que altera os componentes celulares	Antisséptico
Álcoois	Desnaturação das proteínas e dissolução dos lipídeos	Bactericida e fungicida
Metais pesados e seus compostos	Desnaturação das enzimas e de outras proteínas essenciais	Prevenir a oftalmia gonocócica neonatal (nitrato de prata)
Sabões e detergentes	Remoção mecânica de microrganismos através de escovação	Antimicrobianos
Sanitizantes ácido-aniônicos	Incerto; pode envolver a inativação ou a ruptura de enzimas	Sanitização em indústrias
Compostos quaternários de amônio	Inibição enzimática, desnaturação das proteínas, ruptura das membranas plasmáticas	Bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas e viricidas contra vírus envelopados
Ácidos orgânicos	Inibição metabólica, afetando principalmente os bolores; a ação não está relacionada à acidez	Usados para controlar bolores e algumas bactérias
Nitratos/nitritos	O componente ativo é o nitrito, que é produzido pela ação de bactérias sobre o nitrato. Os nitritos inibem algumas enzimas que contêm ferro dos anaeróbios	Conservação dos alimentos
Aldeídos	Desnaturação das proteínas	Antimicrobianos
Óxido de etileno e outros esterilizantes gasosos	Inibem funções vitais da célula	Esterilização de objetos que seriam danificados pelo calor
Esterilização por plasma	Inibem funções vitais da célula	Instrumentos médicos tubulares
Fluidos supercríticos	Inibem funções vitais da célula	Esterilização de implantes médicos

Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

DIFICULDADES DO CULTIVO DE VÍRUS EM LABORATÓRIO

O cultivo de vírus requer um alto custo financeiro, devido a manutenção constante da temperatura durante todo o processo de manipulação a fim de preservar suas estruturas. Com o avanço da biotecnologia (p. ex., a engenharia genética e a produção de novas vacinas) é necessário gerenciar os possíveis riscos à biossegurança, visando minimizar os riscos de contaminação por esses microrganismos em seres humanos, animais e meio ambiente. Ainda, há regulamentações nacionais e internacionais que viabilizam e garantem o direito à biossegurança.

É essencial conhecer as características do microrganismo a ser manipulado, como:

- 1) Grau de patogenicidade;
- 2) Resistência a processos de esterilização;
- 3) Virulência;
- 4) Capacidade mutagênica;
- 5) Transmissão;
- 6) Origem do material potencialmente infeccioso;
- 7) Medidas profiláticas eficazes;
- 8) Tratamento eficaz;
- 9) Dose infectante;
- 10) Condições favoráveis de multiplicação;
- 11) Fatores referentes ao manipulador.

Como é feito o cultivo de vírus em ovos embrionados de galinha?

Os vírus são cultivados em embriões de ovos para a análise do surgimento de anticorpos e/ou a diminuição da reprodução do agente etiológico com a influência da vacina ou para seu desenvolvimento. Os embriões tanto de galinha quanto de pato, não são livres de patógenos específicos, ou seja, são suscetíveis a patógenos viários.

Geralmente, o agente etiológico é cultivado no **saco alantoide**, que é um anexo embrionário com função de armazenamento de produtos da excreção do embrião e a realização das trocas gasosas. O cultivo também pode ser realizado em galinhas adultas por **via intramuscular**, baseando-se na análise dos anticorpos delas e de seus ovos, sendo essa uma transmissão transversal. Os ovos são incubados em diferentes temperaturas, sendo esse um fator influenciador da quantidade e qualidade do antígeno no processo de produção da vacina. A análise de anticorpos e das possíveis cepas é feita pela coleta do líquido amniótico e alantóico ou pelo sangue da galinha.

Para a produção de vacinas são analisadas as seguintes características:

Crescimento das cepas vacinais e rendimento dos antígenos virais, considerando-se a quantidade e qualidade.

MINIATLAS: IMAGENS DE BACTERIOSCOPIA

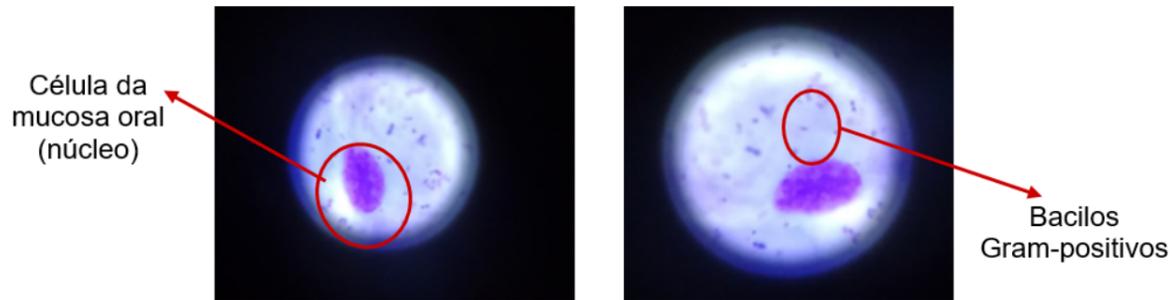
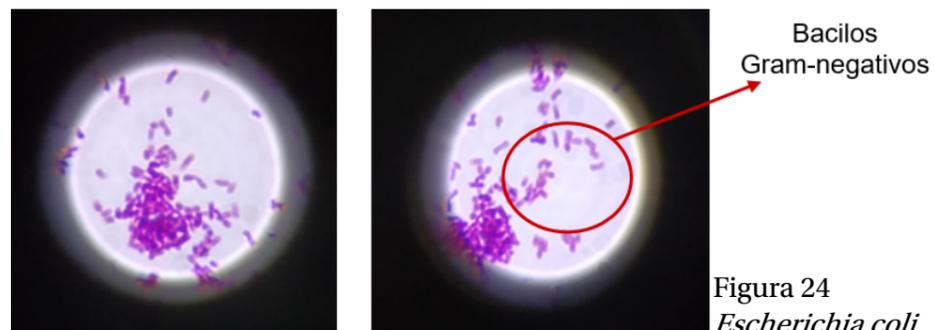
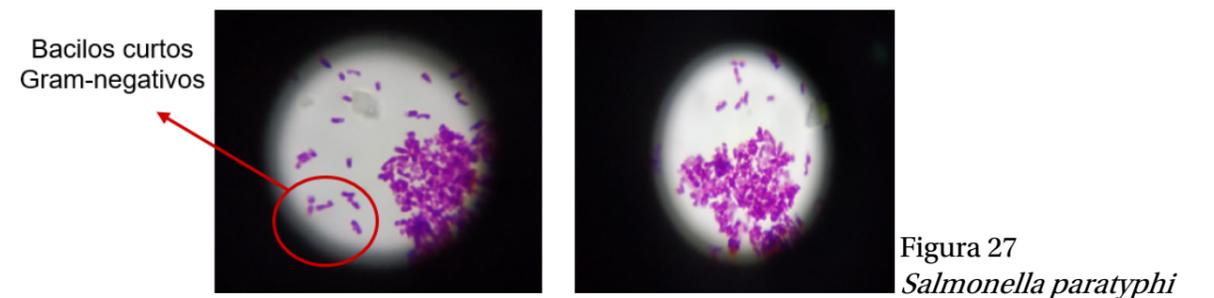
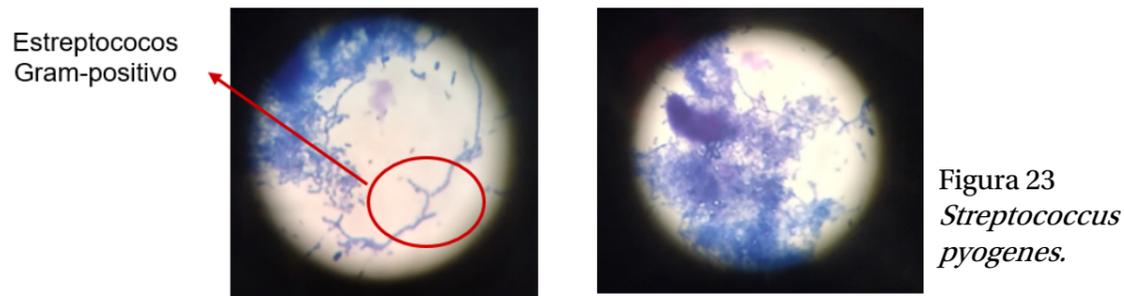
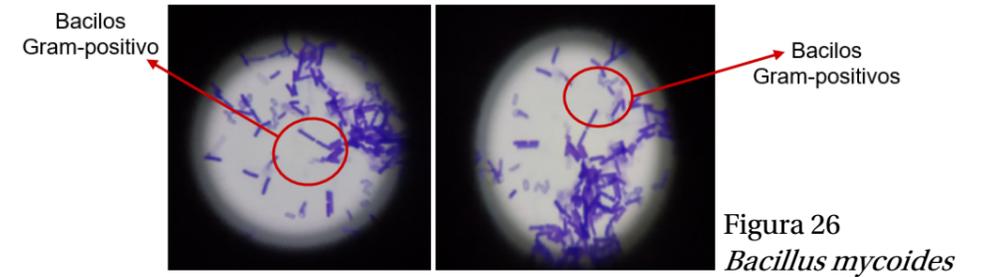
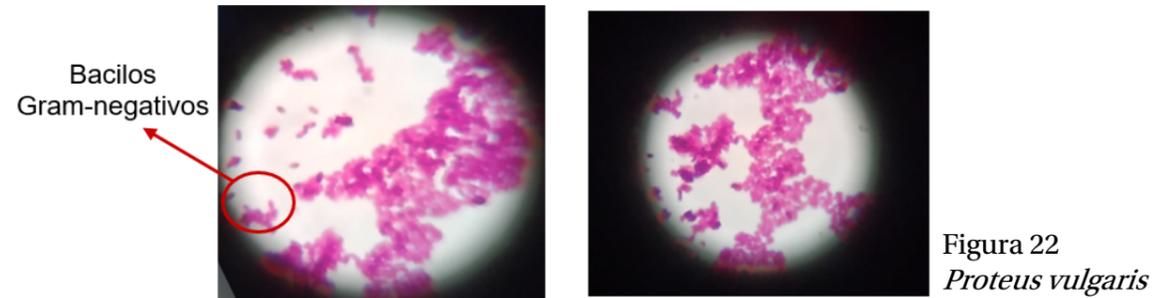
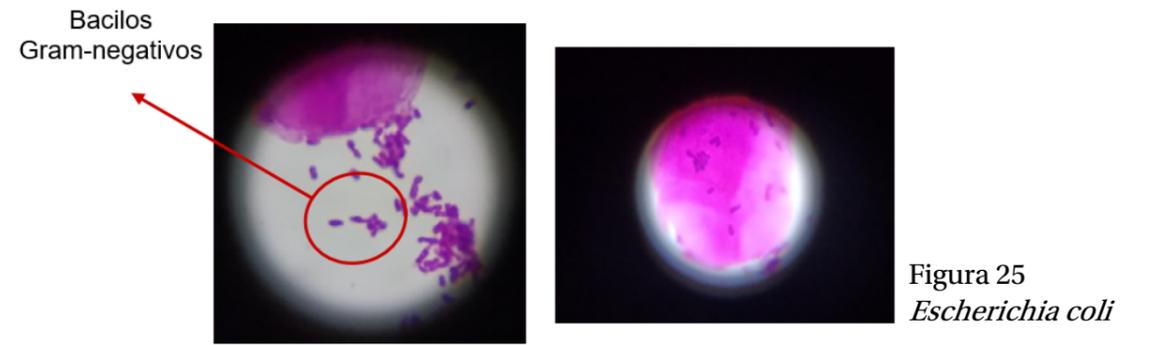


Figura 21 - Bactérias da boca, com bastões Gram-positivo e negativo.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGAR SANGUE. Paraná: LABORCLIN, 2018. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/sangue_agar_tsa_20ml_.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

ÁGARMUELLERHINTON. Paraná: LABORCLIN, 2019. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/agar_mueller_hinton_bula_25012019.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2022

AOUINI, R; LAAMIRI, N; GHRAM, A. **Viral interference between low pathogenic avian influenza H9N2 and avian infectious bronchitis viruses in vitro and in ovo.** *J Virol Methods*, n. 259, p. 92-99, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093418301526?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2022

ANVISA, **módulo 2: gram-negativos fermentadores.** Brasil, 2008. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/isolamento.htm>. Acesso em: 11 nov. 2022.

BLACK, Jacquelyn G.; BLACK, Laura J. **Microbiologia - Fundamentos e Perspectivas.** São Paulo: Grupo GEN, 2021. E-book. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527737326/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

FADER, Robert C. **Burton - Microbiologia para as Ciências da Saúde.** São Paulo: Grupo GEN, 2021. E-book. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527737302/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

GUTTER, B. et al. **Recombinant egg drop syndrome subunit vaccine offers an alternative to virus propagation in duck eggs.** *Avian Pathol*, v. 37, n. 1, p. 33-37, 2008. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079450701784867>>. Acesso em: 23 nov. 2022

KANDEIL, A. et al. **Proteolytic enzymes in embryonated chicken eggs sustain the replication of egg-grown low-pathogenicity avian influenza viruses in cells in the absence of exogenous**

proteases. J Virol Methods, n. 202, p. 28-33. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4033294/>>. Acesso em: 23 nov. 2022

KHALILI, I. et al. **Optimization of incubation temperature in embryonated chicken eggs inoculated with H9N2 vaccinal subtype of avian influenza virus. Vet Res Forum**, v. 4, n. 3, p. 145-148, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312372/>>. Acesso em: 23 nov. 2022

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Grupo A, 2016. E-book. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582712986/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

MURRAY, Patrick. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Grupo GEN, 2017. E-book. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595151741/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

NICOLSON, C. et al. **The Ability of a Non-Egg Adapted (Cell-Like) A(H1N1)pdm09 Virus to Egg-Adapt at HA Loci Other than 222 and 223 and Its Effect on the Yield of Viral Protein. PLoS One**, v. 18, n. 11, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5115798/>>. Acesso em: 23 nov. 2022

PENNA, P.M.M. et al. **BIOSSEGURANÇA: UMA REVISÃO**. Arquivos do Instituto Biológico [online]. v. 77, n. 3, pp. 555-565, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aib/a/hqt8HGY9DP6zrbSFCKRz4jt/?lang=pt>>. Acesso em: 21 set 2022.

SALVATIERRA, Clabijo M. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Saraiva, 2014. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536530550/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Grupo A, 2017. E-book. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713549/>>. Acesso em: 28 set. 2022.

Universidade Estadual de Maringá (UEM). **Laboratório de microbiologia animal**. Paraná, 2006. Disponível em: <http://www.cpr.uem.br/pite/index.php/infraestrutura-tecnologica/laboratorios/3089-laboratorio-de-microbiologia-veterinaria>. Acesso em: 16 mai. 2023.

VERMELHO, Alane B. **Práticas de Microbiologia**. São Paulo: Grupo GEN, 2019. E-book. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527735575/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

