

Guia Prático de orientações Básicas de



Microbiologia

Andresa Corrêa Pinto
Karla Tereza Silva Ribeiro



Guia Prático de Orientações Básicas de

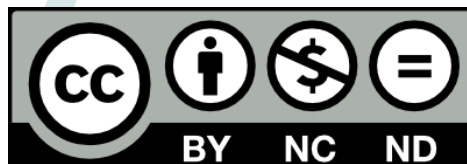


Microbiologia

Andresa Corrêa Pinto

Karla Tereza Silva Ribeiro

This work is licensed under the Creative Commons Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.



©2022 por Andresa Corrêa Pinto e Karla Tereza Silva Ribeiro
Todos os direitos reservados.

1ª edição

Digramação e projeto gráfico: as autoras.

Conselho editorial / Colaboradores

Márcia Aparecida da Silva Pimentel – Universidade Federal do Pará, Brasil
José Antônio Herrera – Universidade Federal do Pará, Brasil
Márcio Júnior Benassuly Barros – Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil
Miguel Rodrigues Netto – Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Wildoberto Batista Gurgel – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil
André Luiz de Oliveira Brum – Universidade Federal de Rondônia, Brasil
Mário Silva Uacane – Universidade Licungo, Moçambique
Francisco da Silva Costa – Universidade do Minho, Portugal
Ofélia Pérez Montero - Universidad de Oriente – Santiago de Cuba, Cuba

Editora-chefe: Viviane Corrêa Santos – Universidade do Estado do Pará, Brasil
Editor e web designer: Walter Luiz Jardim Rodrigues – Editora Itacaiúnas, Brasil
Editor e diagramador: Deivid Edson Corrêa Barbosa - Editora Itacaiúnas, Brasil

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

P659g Guia Prático de Orientações Básicas de Microbiologia. [recurso eletrônico] /
Andresa Corrêa Pinto e Karla Tereza Silva Ribeiro . - 1. ed. – Ananindeua :
Itacaiúnas, 2022.
56 p.: PDF ; 4,95 MB.

Inclui Bibliografia e Sumário.

ISBN: 978-65-89910-96-1 (e-book)

DOI: 10.36599/itac-gporbm

1. Biologia, ciências da vida. 2. Microbiologia. 3. Guia prático. I. Título.

CDD 570

CDU 576

Índice para catálogo sistemático:

1. Biologia, Ciências da Vida 570
2. Microbiologia 576

E-book publicado no formato PDF (*Portable Document Format*). Utilize software [Adobe Reader](#) para uma melhor experiência de navegabilidade nessa obra.

O conteúdo desta obra, inclusive sua revisão ortográfica e gramatical, bem como os dados apresentados, é de responsabilidade de seus participantes, detentores dos Direitos Autorais.

Esta obra foi publicada pela Editora Itacaiúnas em agosto de 2022.

SUMÁRIO

0	Prefácio.....	5
1	Procedimentos de Biossegurança no Laboratório de Microbiologia.....	7
2	Técnica de Coloração de Gram e Bacterioscopia.....	12
3	Técnica de Coloração de Ziehl Neelsen.....	19
4	Técnicas Básicas de Semeadura.....	23
5	Meios de Cultura	27
6	Teste do Antibiograma.....	37
7	Urocultura.....	41
8	Coprocultura.....	46
9	Hemocultura.....	49
10	Referências.....	53

O primeiro importante marco da Microbiologia foi a invenção do microscópio, no início do século XVII, por Antony Van Leeuwenhoek. O microscópio possuía apenas uma lente, a qual permitia um aumento visual de 300 vezes. Leeuwenhoek usou o microscópio simples com uma única lente para observar os pequenos seres vivos em amostras de solo, rio, saliva e fezes, denominando-os de “animálculos”. O microscópio primitivo foi aprimorado por Robert Hooke, com a inserção de uma lente que permitia maior aumento do campo de visão. A partir das observações de Leeuwenhoek e Hooke foram descobertas as células, que posteriormente foram reconhecidas como a unidade fundamental da vida.

O aperfeiçoamento do microscópio e as contribuições dadas pelo francês Louis Pasteur, permitiu que a teoria da abiogênese fosse derrubada, a qual defendia o surgimento de vida a partir da matéria não viva. Desse modo, surge a teoria da biogênese no século XIX, defendida por Pasteur e outros que compartilhavam dessa teoria, que por meio de dois experimentos conseguiu demonstrar a impossibilidade da geração espontânea.



Outro grande nome na chamada “Idade de Ouro da Microbiologia”, foi o médico alemão Robert Koch, que através de seus postulados fez associação dos micróbios com as doenças, contribuindo ainda com a descoberta de vários agentes de doença, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* e *Bacillus anthracis*.



O médico Alexander Fleming, por sua vez, ao estudar a bactéria *Staphylococcus aureus*, descobriu de modo acidental a penicilina. Fleming deixou uma de suas culturas de *S. aureus* aberta e, naturalmente, houve o crescimento de fungos na placa. Entretanto, Fleming observou que onde cresceu o fungo não houve crescimento bacteriano. Assim, o médico constatou que o fungo, identificado como *Penicillium notatum*, produzia uma substância que impedia o crescimento bacteriano.

Em 1938, a penicilina foi isolada por Ernst B. Chain e Howard W. Florey. Devido a Segunda Guerra Mundial, havia uma grande necessidade de tratar os feridos, por isso, Florey deu continuidade à pesquisa de Fleming e extraiu um pó marrom do fungo cultivado. Essa substância foi testada em muitos tipos de bactérias, com grande eficácia. Este foi o primeiro antibiótico natural produzido na história, e a partir dessa descoberta, a indústria passou a produzir penicilina e outros antibióticos para o combate de infecções, como tuberculose, sífilis e pneumonia.



Todos esses representam grandes nomes na história da microbiologia, cujos estudos tornaram-se base para diversas pesquisas, agregando a esta área um conhecimento cada vez mais refinado. Atualmente, os laboratórios de microbiologia possuem sistemas automatizados com tecnologia avançada para o diagnóstico fidedigno dos microrganismos patogênicos, possibilitando ao paciente maior rapidez na emissão de resultados, bem como um tratamento mais preciso.



**PROCEDIMENTOS DE
BIOSEGURANÇA NO
LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA**

OBJETIVOS

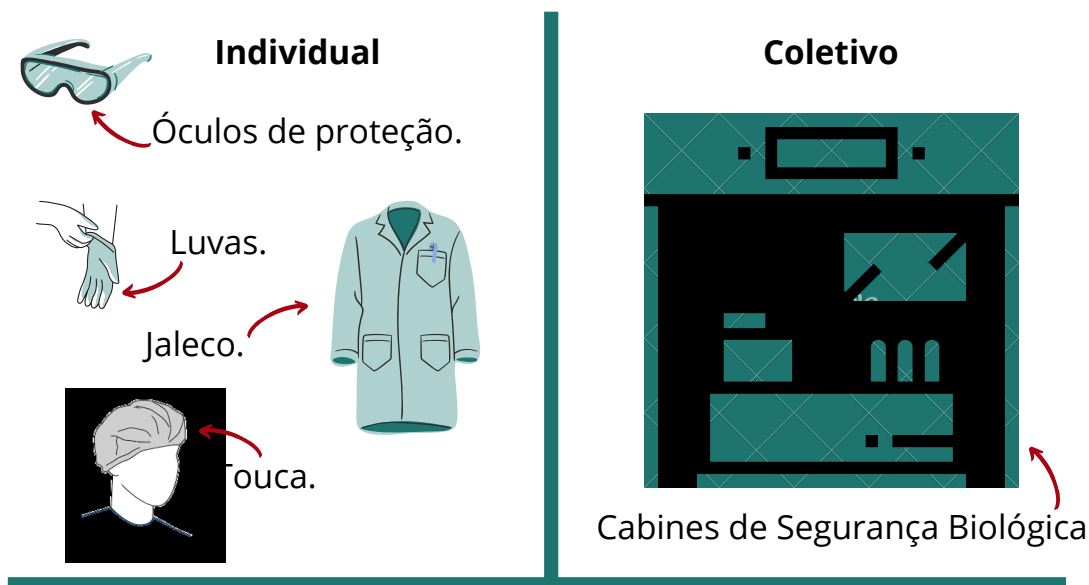
- Conhecer as Normas de Biossegurança necessárias na execução de procedimentos no Laboratório de Microbiologia.
- Identificar os riscos dos agentes biológicos no Laboratório de Microbiologia.
- Realizar os procedimentos adequados no laboratório, visando a segurança da equipe técnica e do ambiente.

1. INTRODUÇÃO

A biossegurança diz respeito a todas as ações que estão voltadas à prevenção, minimização ou eliminação de riscos biológicos nos procedimentos laboratoriais, assegurando a proteção do homem, do ambiente interno e externo, bem como melhorando a qualidade do trabalho. De acordo com estas normas, é fundamental a utilização de barreiras de contenção de microrganismos no ambiente de trabalho, ou seja, de métodos de segurança para a manipulação do material biológico (sangue, fezes, urina e outros). Assim, o objetivo do uso de contenção é reduzir ou eliminar a exposição da equipe laboratorial, de outros indivíduos e do meio ambiente quanto aos agentes infecciosos. A contenção pode ser de nível primário ou secundário. No nível primário, a contenção garante a proteção da equipe laboratorial e do local de trabalho por meio do uso de equipamento de segurança adequado e pelo seguimento correto das técnicas de microbiologia, além da imunização por meio da vacina, a qual assegura a proteção pessoal.

Por outro lado, a contenção secundária garante a proteção do meio externo ao laboratório, sendo realizada através de um bom projeto de infraestrutura e das instalações, além de boas práticas operacionais. Portanto, a contenção inclui três elementos: o projeto de instalação laboratorial, o equipamento de segurança e a técnica laboratorial. O equipamento de segurança compreende os equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC). Como equipamentos de proteção individual, a equipe laboratorial deve sempre usar luvas, jalecos, toucas, máscaras, óculos de proteção, entre outros. Ademais, os equipamentos de proteção coletiva, como as cabines de segurança biológica, também devem ser utilizados.

Os equipamentos de segurança incluem os de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC)



Os laboratórios clínicos e de diagnóstico são considerados laboratórios de nível de biossegurança 2, pois nestes são manipulados agentes de risco moderado. Nos laboratórios de nível B2, muitas atividades podem ser realizadas em bancadas abertas, desde que a formação de aerossóis ou borrifos seja baixa. Já as atividades que aumentam o risco de exposição do microbiologista devem ser realizadas em cabines de segurança biológica.

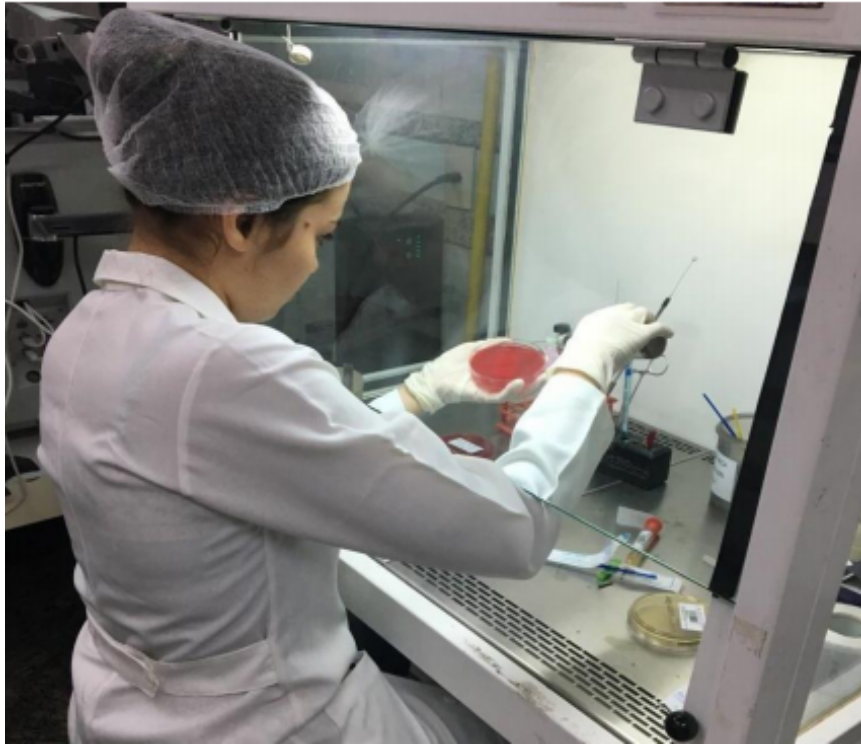
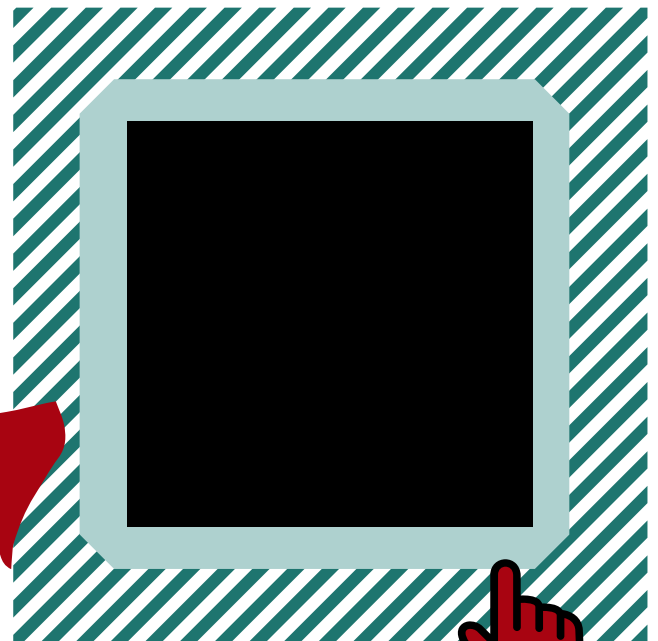


Figura 1 - Uso de EPI e EPC durante o semeio de hemocultura positiva.

Fonte: A autora



PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1 Reconhecer a simbologia do laboratório e identificar os riscos.



2 Fazer a limpeza da área de trabalho no início e término do procedimento com auxílio do álcool a 70%.



3 Não é permitido comer ou guardar alimentos no laboratório.



4 Não é permitido fumar no laboratório..

6 Usar os Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC), como a Cabine de Segurança Biológica.



5 No laboratório, a equipe técnica deve usar calça comprida e sapatos fechados.



7 Usar os Equipamentos de Proteção Individual (EPI): jalecos, óculos, máscaras, gorro, luvas.

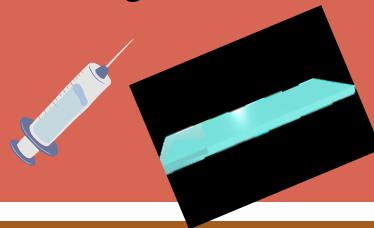


8 Não utilizar acessórios no laboratório, como pulseira, brincos, relógio e outros.



9 Realizar a lavagem correta das mãos no início e final dos procedimentos laboratoriais.

10 Deve-se tomar muito cuidado durante o manuseio de perfurocortantes. Não reencapar agulhas.



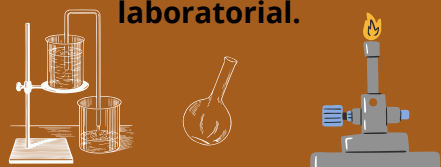
11 Avisar a equipe técnica do laboratório sobre as anormalidades na execução de procedimentos e/ou contaminação acidental.



12 Não colocar material contaminado sobre a bancada. Proceder o descarte no local adequado.



13 Realizar a flambagem de tubos de ensaio, alças de inoculação, pinças e outros materiais, antes e no final do procedimento laboratorial.



14 Cuidado ao acender o bico de Bunsen. Afastar as substâncias inflamáveis, como o álcool a 70%.



15 Realizar os procedimentos laboratoriais na região estéril do bico de Bunsen (abertura e fechamento de tubos de ensaio e placas de Petri).

16 Seguir as recomendações dos protocolos de segurança e as boas práticas de procedimentos no laboratório, visando a segurança da equipe técnica e do ambiente de trabalho.



**TÉCNICA
DE COLORAÇÃO DE
GRAM E
BACTERIOSCOPIA**

OBJETIVOS

- Conhecer a técnica de Coloração de Gram e sua utilidade no exame de bacterioscopia para o diagnóstico laboratorial.
- Realizar a Coloração de Gram e conhecer o seu fundamento.
- Identificar as características tintoriais das bactérias, formas básicas e tipos de arranjos a partir da Coloração de Gram.

1. INTRODUÇÃO

A Bacterioscopia é um método utilizado para a visualização de bactérias a partir do preparo de um esfregaço da amostra biológica em lâmina, seguido de coloração específica e visualização no microscópio óptico. A partir desse exame, é possível visualizar as formas básicas das bactérias (cocos, bacilos, espirilos etc.) e o seu arranjo (pares, cadeias, cachos, tétrades etc.), tornando-se útil para diagnosticar algumas infecções de forma rápida, antes do crescimento em meios de cultura específicos utilizados no isolamento do microrganismo.

A bacterioscopia pode ser realizada para vários tipos de amostra biológica, como escarro, urina, líquido e secreção vaginal. A bacterioscopia de secreção vaginal é bastante comum, sendo solicitada para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, fungos e outros microrganismos. Para a análise do material, são preparadas duas lâminas: Na primeira lâmina, é realizado o esfregaço e a Coloração de Gram; e, na segunda, o material é analisado a fresco.

A técnica de coloração de Gram foi idealizada pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram em 1884, e é a coloração diferencial mais utilizada nos laboratórios de Microbiologia e de Análises Clínicas, auxiliando no diagnóstico presuntivo de um agente infeccioso. Essa técnica de coloração permitiu classificar as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Através da coloração de Gram é possível observar as bactérias de acordo com suas características morfológicas e tintoriais, após tratamento com agentes químicos específicos: cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina básica. As bactérias Gram-positivas apresentam coloração roxa, enquanto as bactérias Gram-negativas apresentam coloração vermelha.

Bactérias Gram-positivas



Bactérias Gram-negativas

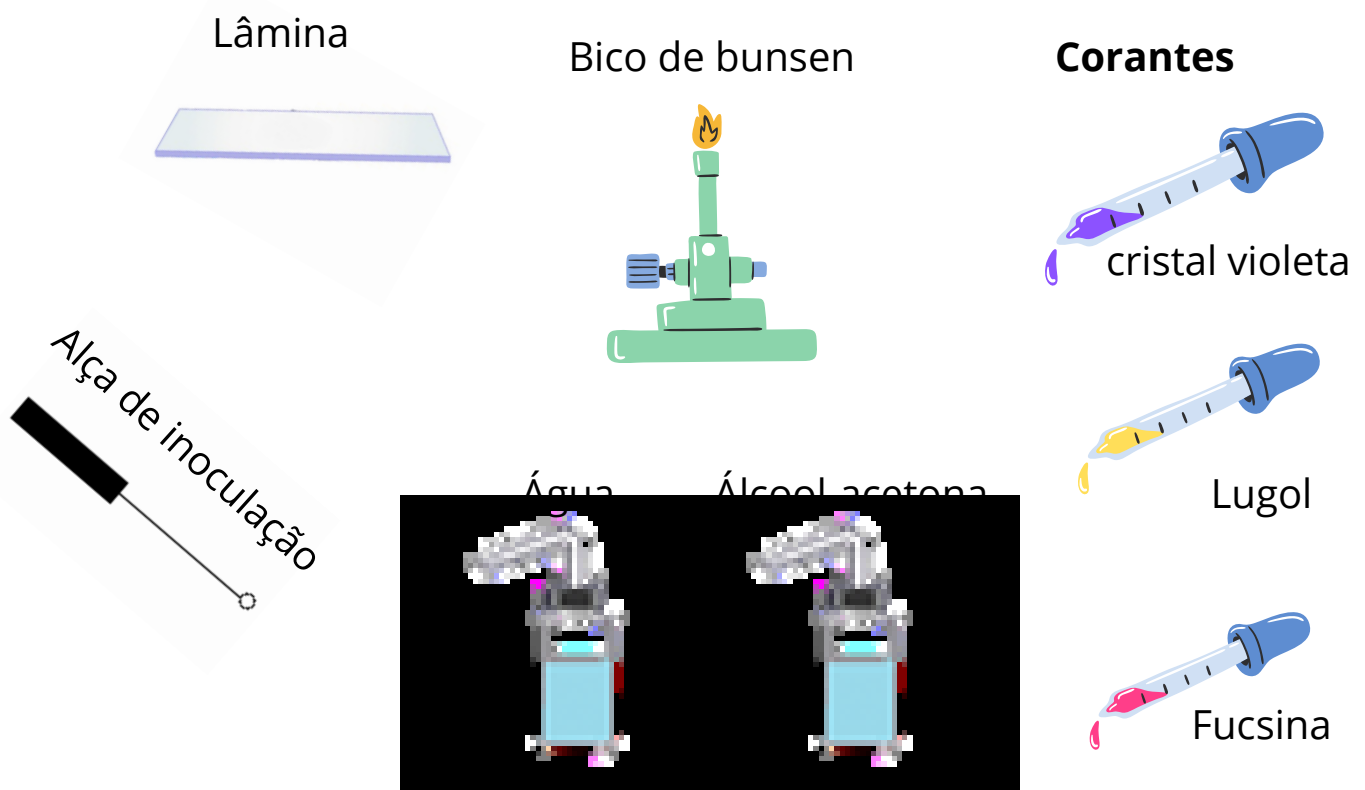


O princípio do método de coloração de Gram é baseado na composição da parede celular bacteriana. As bactérias Gram-positivas apresentam uma camada espessa de peptidoglicano ligada aos ácidos teicoicos e lipoteicoicos, os quais, por sua vez, se ligam à membrana celular. Já as bactérias Gram-negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano e uma camada externa composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos.

O procedimento laboratorial consiste em cobrir o esfregaço bacteriano em lâmina de microscopia com o corante básico cristal violeta. Logo após, a lâmina é coberta com a substância fixadora, o lugol. Os dois grupos de bactérias absorvem de modo igual o corante primário e o fixador, formando o complexo cristal violeta-iodo, de coloração roxa. Em seguida é utilizado o solvente álcool-acetona que irá agir sobre a porção fosfolipídica das membranas celulares, incluindo a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Nas bactérias Gram-positivas o corante é retido, devido a sua camada espessa de peptidoglicano. Já as bactérias Gram-negativas, por possuírem uma fina camada de peptidoglicano e alto teor de lipídios em suas membranas celular e externa, são descoradas. Por fim, é utilizado o corante secundário, a fucsina básica, corando em vermelho as células que foram descoradas pelo álcool-acetona.

2. PROCEDIMENTO TÉCNICO

2.1 Equipamentos e materiais necessários



2.2 Preparo do esfregaço em lâmina e fixação

Utilizar lâminas limpas e desengorduradas e identificar a lâmina de maneira segura, usando lâminas com extremidade fosca.

- **Cultura bacteriana em meio líquido:** com auxílio de uma alça de inoculação em anel, retirar uma alíquota da cultura bacteriana em meio líquido e depositar na superfície de uma lâmina de microscopia, em movimentos circulares (elipsoide) de dentro para fora. Em seguida flambar a alça de inoculação e deixar a lâmina secar ao ar livre. Proceder a fixação do material passando a lâmina duas a três vezes na chama do bico de Bunsen.
- **Cultura bacteriana em meio sólido:** colocar uma gota de solução fisiológica (NaCl 0,9%) no centro da uma lâmina. Com auxílio de uma alça de inoculação em anel retirar uma porção da cultura bacteriana (cultivo na placa de Petri ou tubos de ensaio) e emulsionar na solução em movimentos circulares (elipsoide) de dentro para fora. Em seguida flambar a alça de inoculação e deixar a lâmina secar ao ar livre. Proceder a fixação do material passado a lâmina duas a três vezes na chama do bico de Bunsen.
- **Material Biológico (amostras diretas):** Espalhar a amostra no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, deixar secar ao ar livre. Proceder a fixação do material passado a lâmina duas a três vezes na chama do bico de Bunsen.

2.3 Procedimento de Coloração de Gram

Cobrir toda a lâmina com a solução de violeta de genciana, aguardar por um minuto e desprezar o corante. Cobrir a lâmina com o lugol, aguardar por um minuto e desprezar o mordente. Remover o lugol da lâmina gotejando o descorante álcool-acetona até que o líquido se torne incolor (em torno de 15 segundos). Lavar rapidamente a lâmina em água corrente. Cobrir a lâmina com a solução de fucsina para Gram (ou safranina), deixando atuar por 30 segundos. Lavar a lâmina com água corrente, deixar secar na posição vertical e observar no microscópio óptico usando a objetiva de imersão (100X).

2.4 Observação Microscópica

No microscópio óptico, observar a morfologia, tipos de arranjos e propriedade tintorial das bactérias utilizando a objetiva de imersão (100X). As células microbianas que apresentarem a coloração roxa (púrpura escura) são consideradas Gram-positivas, ao passo que as coradas em tonalidade avermelhada são consideradas Gram-negativas.

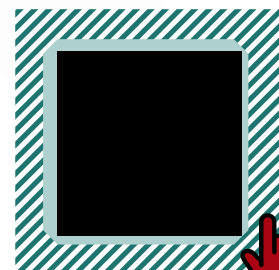
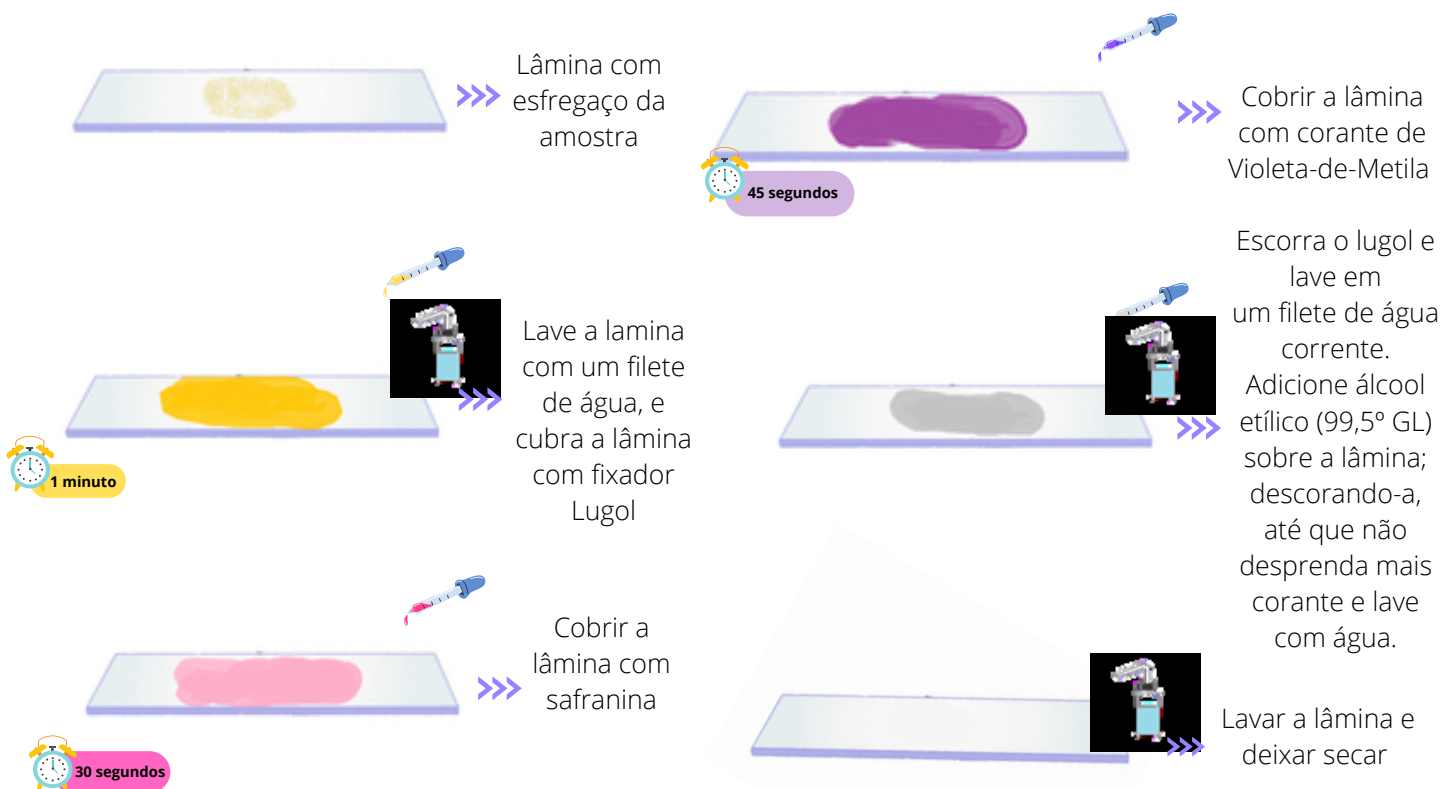
2.5 Modificações na Coloração de Gram

Atualmente, existem corantes que substituem aqueles utilizados tradicionalmente na coloração de Gram:

MÉTODO DE GRAM	CORANTES SUBSTITUTOS	VANTAGENS
Violeta-de-genciana	Violeta-de-metila	Esse corante já possui um fixador, dispensando a fixação do esfregaço em chama, que promove brusca desidratação dos componentes celulares.
Lugol	-	-
Álcool-acetona	Álcool etílico (99,5° Gay-Lussac)	O álcool-acetona demanda grande habilidade de quem executa a técnica para que não ocorra hiperdescoloração.
Fucsina	Safranina	No espectro de cor, a Safranina se distancia mais do corante primário quando comparada à Fucsina, permitindo melhor diferenciação e nitidez entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.6 Procedimento de Coloração de Gram Adaptado

Cubra o esfregaço com violeta-de-metila e deixe por aproximadamente 15 segundos. Adicione igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta-de-metila e deixe agir por mais 45 segundos. Escorra o corante e lave em um filete de água corrente; Cubra a lâmina com lugol diluído (1/20) e deixe agir por aproximadamente 1 minuto. Escorra o lugol e lave em um filete de água corrente. Adicione álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina; descorando-a, até que não desprenda mais corante. Lave em um filete de água corrente. Cubra a lâmina com safranina e deixe agir por aproximadamente 30 segundos. Lave em um filete de água corrente. Deixe secar ao ar livre, ou seque suavemente, com o auxílio de um papel de filtro limpo. Coloque uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e leia em objetiva de imersão (100 X).





TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL NEELSEN

OBJETIVOS

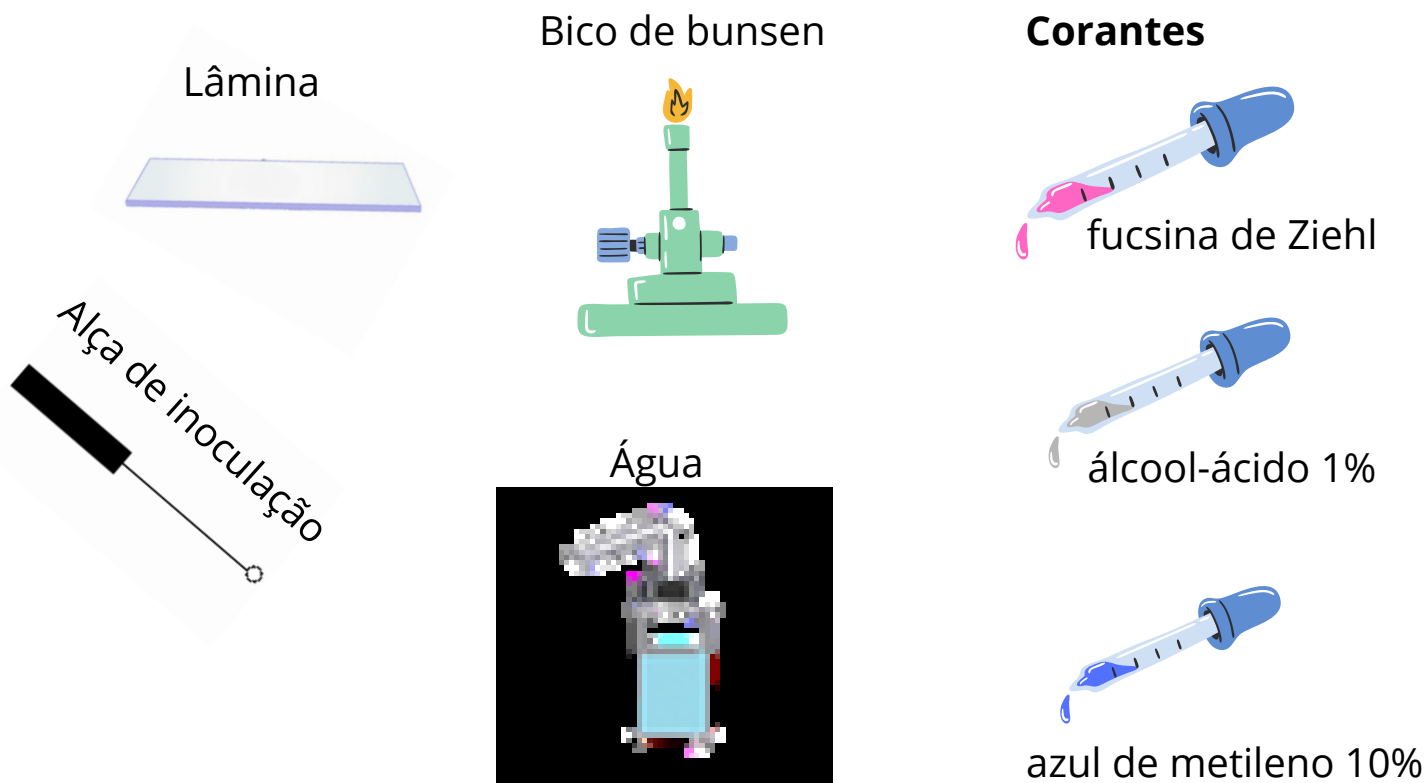
- Conhecer a técnica de Coloração de Ziehl Neelsen e sua utilidade.
- Realizar Coloração de Ziehl Neelsen e conhecer o seu fundamento.
- Identificar os Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR).

1 INTRODUÇÃO

Existem bactérias que resistem à coloração de Gram, conhecidas como Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). Dentro desse grupo, se encontra o gênero *Mycobacterium* sp, o qual contém as bactérias causadoras de hanseníase e tuberculose. Para essas bactérias, é necessário que seja feita uma coloração mais agressiva, conhecida como coloração de Ziehl Neelsen. Na composição da parede celular do BAAR estão presentes lipídeos complexos (ácidos graxos e ceras), os quais conferem à estas bactérias a propriedade de álcool ácido resistência. Devido a carbofucsina ser mais solúvel na parede celular que no álcool ácido e se fixar firmemente nos lipídeos da parede celular, os BAAR se coram em vermelho, e outras bactérias sem estes lipídeos complexos em sua parede celular são descoradas e adquirem a coloração azul do corante de fundo.

2. PROCEDIMENTO TÉCNICO

2.1 Equipamentos e materiais necessários



2.2 Preparo do esfregaço em lâmina

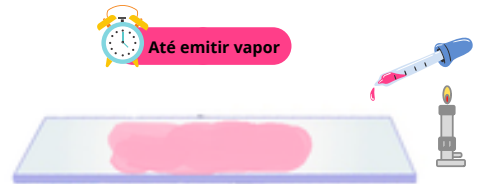
Esse procedimento deve ser realizado dentro da câmara de segurança biológica. Para a confecção do esfregaço, devem ser utilizadas lâminas limpas e desengorduradas, após identificação da lâmina de maneira segura, na sua extremidade fosca. O esfregaço deve ser realizado com o auxílio de palito, sempre no mesmo sentido, cobrindo dois terços da lâmina, a qual deve secar dentro da câmara de fluxo.

2.3. Procedimento de Coloração de Ziehl Neelsen

Primeiramente, o esfregaço é coberto com carbofucsina por cinco minutos. Durante esse período, a lâmina deve ser flambada por três vezes até que vapores sejam emitidos, com o cuidado de não aquecer a lâmina drasticamente. Após esse processo, deve ser feita a lavagem da lâmina com álcool-ácido clorídrico até que todo o corante se desprenda, por cerca de dois minutos. Por fim, o corante azul-de-metileno é adicionado sobre a lâmina por dois minutos.



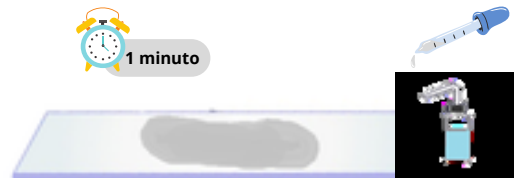
Fixar material na lâmina com auxílio do bico de bunsen



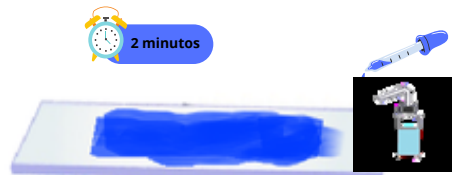
Cobrir com fucsina de Ziehl, e aquecer a região inferior da lâmina



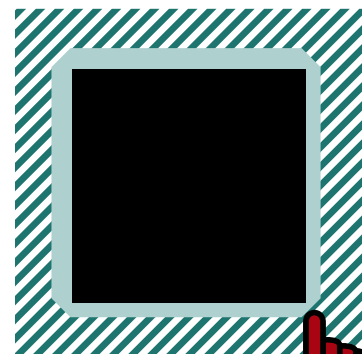
Lavar a lâmina com água



Cobrir o esfregaço com álcool-ácido 1%, após isso lavar a lâmina com água



Cobrir com azul de metileno 10%, após o tempo lave com água





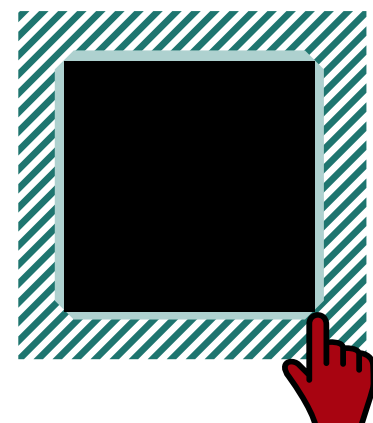
TÉCNICAS BÁSICAS DE SEMEADURA

OBJETIVOS

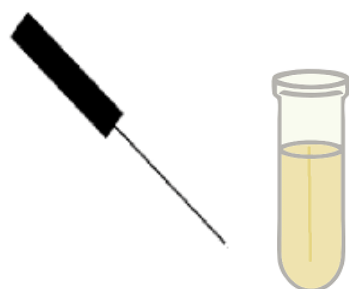
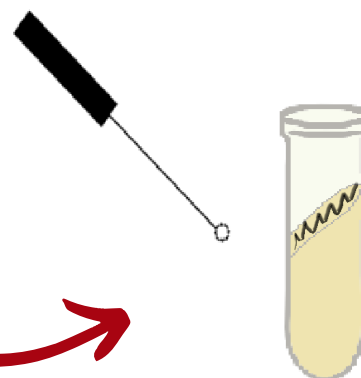
- Realizar a semeadura de bactérias em diferentes meios de cultura.
- Conhecer as técnicas básicas de semeadura.

1 INTRODUÇÃO

Existem várias técnicas utilizadas para a inoculação dos diversos tipos de amostra no meio de cultura, como as técnicas de esgotamento em quadrantes e de inserção profunda no meio de cultura, também conhecida como picada em profundidade. A técnica de picada em profundidade, por exemplo, pode ser utilizada para testar a motilidade bacteriana, e a técnica de esgotamento em quadrantes para o isolamento das colônias.

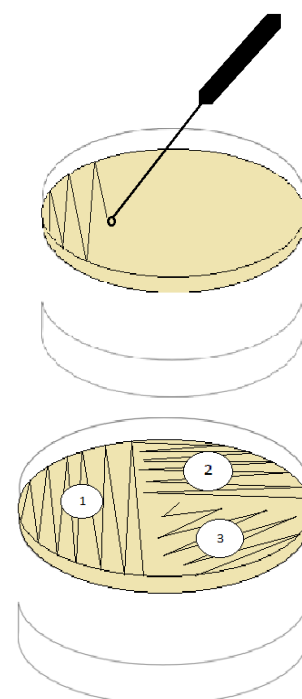


Quanto à técnica utilizada para a inoculação da **amostra em meio líquido**, é transferida uma alíquota da cultura utilizando a alça de inoculação em anel; em **meio de cultura sólido inclinado**, o semeio da colônia é realizado com estrias na superfície.



Em meio de cultura semissólido em tubo, é realizada a inoculação por inserção profunda no meio com a alça de inoculação reta.

Em meio de cultura sólido em placa, é utilizada a técnica de esgotamento em quadrantes. Neste procedimento é utilizada a alça de inoculação em forma de anel.



Os meios são escolhidos de acordo com o tipo de amostra a ser semeada. Dessa forma, por exemplo, amostras de urina são semeadas no meio Ágar CLED ou Ágar Sangue e Mac Conkey, entre outros, amostras de fezes nos meios Ágar Salmonella-Shigella e Ágar MacConkey, amostras de secreção traqueal em Ágar Sangue e Ágar MacConkey e líquidos nobres, como LCR, e biópsias em Ágar Chocolate e MacConkey.

TIPOS DE SEMEIO EM AMOSTRAS DIFERENTES

TIPO DE AMOSTRA	ESQUEMA DIDÁTICO	REAL
Fezes e secreção vaginal		
Urina, secreção traqueal, hemocultura positiva e swabs de vigilância		
Ponta de cateter		



MEIOS DE CULTURA

OBJETIVOS

- Conhecer os principais meios de cultura.
- Identificar quais meios são mais indicados para a semeadura de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

1 INTRODUÇÃO

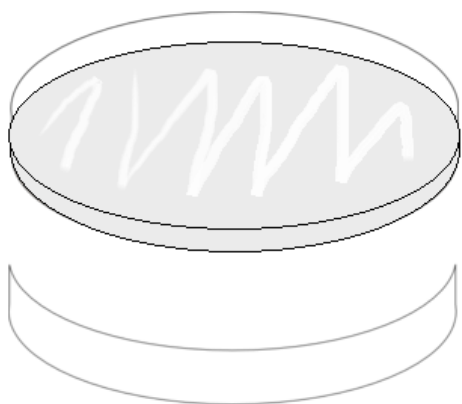
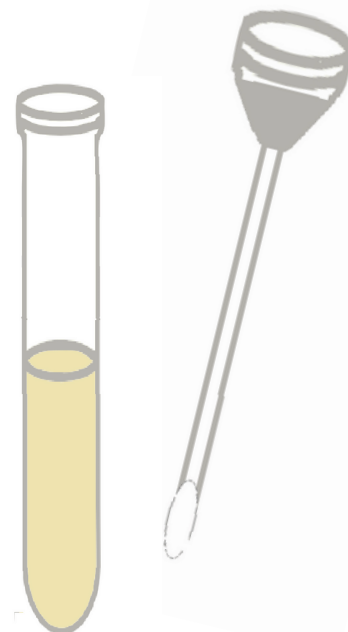
Os meios de cultura são preparações desenvolvidas com o intuito de proporcionar um ambiente contendo os nutrientes e as condições físico-químicas necessárias para o crescimento de microrganismos. As exigências nutricionais estão relacionadas com a fonte de energia utilizada pelos microrganismos, enquanto as condições físico-químicas dizem respeito às condições de pH e pressão osmótica ideais. Há uma série de meios de cultura para crescimento de bactérias, cada qual com sua função. De acordo com sua composição, os meios podem servir para transporte e conservação de microrganismos, manutenção de culturas, recuperação, enriquecimento, isolamento e para provas de identificação. Ademais, os meios podem ser classificados de acordo com a sua composição (meio sintético ou complexo), consistência (meio líquido, semissólido ou sólido) e forma de preparo (meio pronto para uso, desidratado ou formulado).

2. PRINCIPAIS MEIOS DE CULTURA E SUAS FINALIDADES

2.1 Meios de Cultura para Transporte e Conservação

Meio Stuart: é utilizado para transporte e conservação de diversos tipos de materiais, conservando microrganismos patogênicos como *Haemophilus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp. A sua composição nutritiva garante a sobrevivência das bactérias, porém, devido à ausência de uma fonte de nitrogênio, elas não se multiplicam consideravelmente.

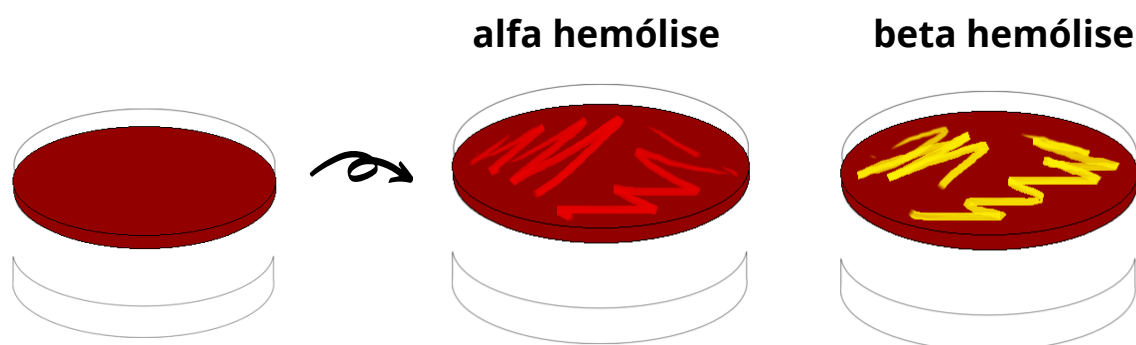
Cary Blair: desenvolvido a partir do meio Stuart, o meio Cary Blair é utilizado para transporte e conservação de material fecal, pois tanto microrganismos patogênicos quanto coliformes fecais sobrevivem nesse meio.



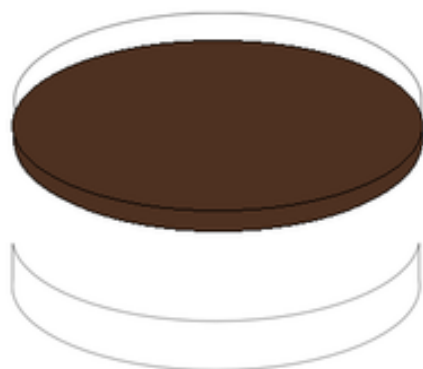
Ágar Nutriente: é frequentemente usado para a conservação e manutenção de culturas à temperatura ambiente em laboratórios que não possuem a opção de crioconservação das cepas. Pode também ser utilizado para a análise de água, ar, leite e alimentos, funcionando como meio de cultivo preliminar para exames bacteriológicos e de isolamento de microrganismos para culturas puras.

3.2 Meios de Cultura para Crescimento e Isolamento

Ágar Sangue: favorece o crescimento da maioria dos microrganismos. Pode ser utilizado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos, para a verificação de hemólise e diferenciação de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., e também para a identificação presuntiva de *Haemophilus* spp. (prova de satelitismo).

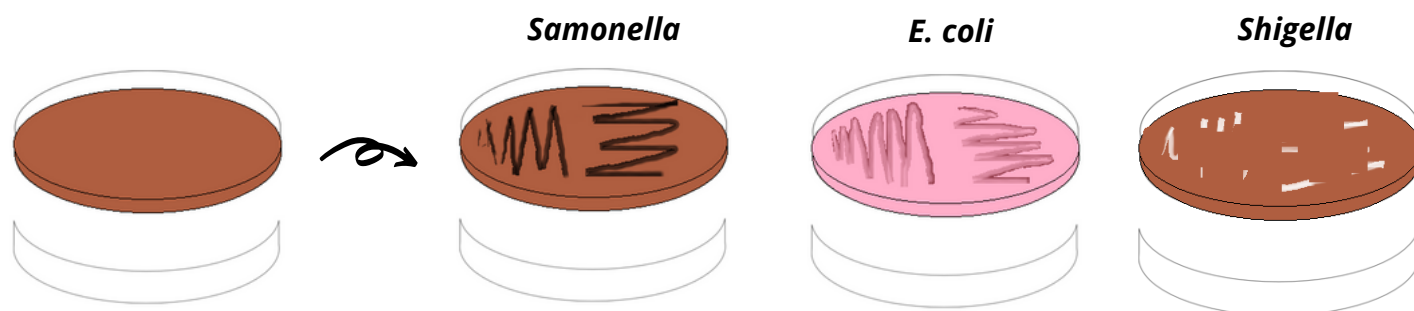


Ágar Chocolate: é utilizado para o crescimento de microrganismos exigentes, apesar de crescerem quase todos os tipos de microrganismos nesse meio. É adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho a esse meio em alta temperatura, ocasionando a lise das hemácias e consequente liberação de hemina e hematina, as quais são necessárias para o crescimento de microrganismos exigentes. Quando a incubação é realizada em CO₂, este meio garante o crescimento dos microaerófilos. Geralmente é utilizado para o crescimento de *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella* spp.

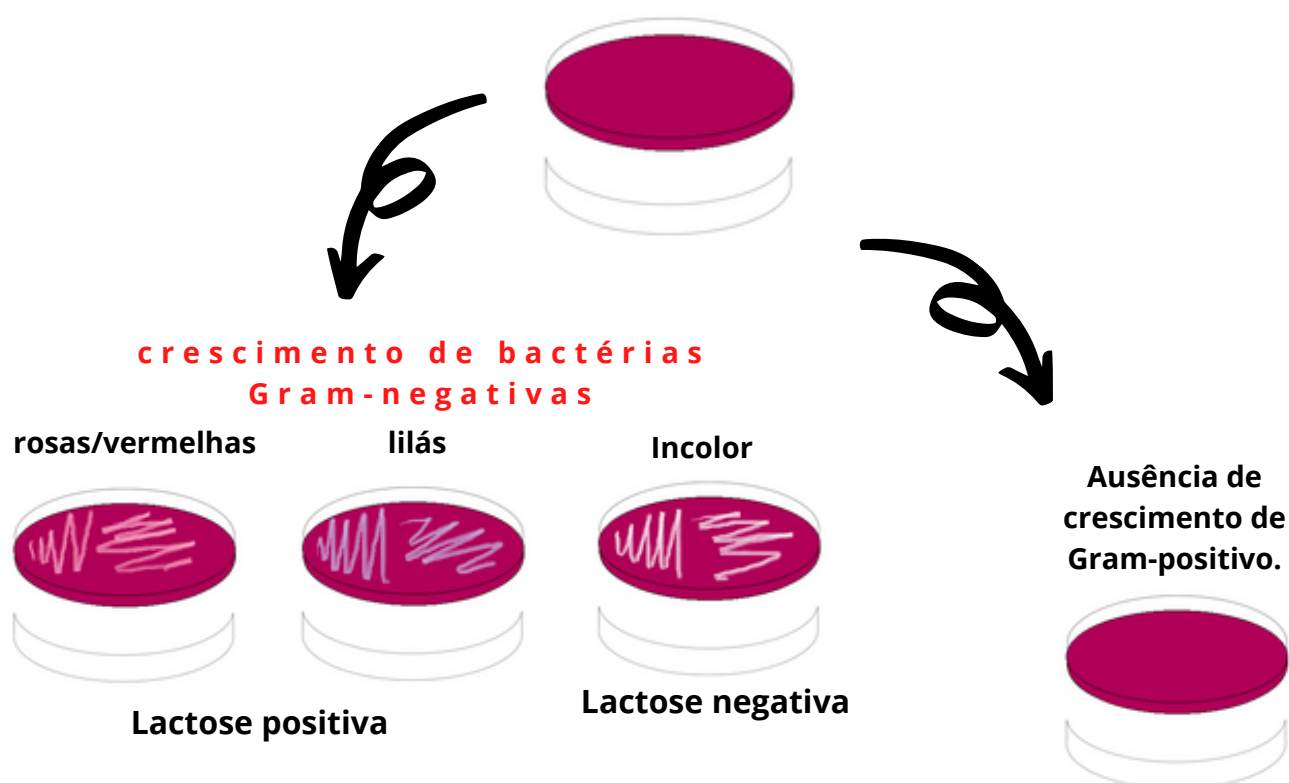


3.2 Meios de Cultura para Crescimento e Isolamento

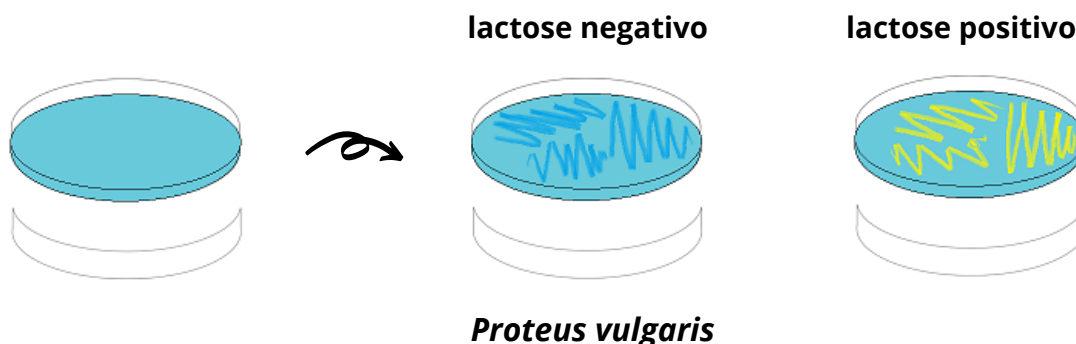
Ágar Salmonella-Shigella (SS): esse meio possui componentes que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas, além disso, permite identificar bactérias fermentadoras de lactose, assim como bactérias produtoras de H₂S. É utilizado para o isolamento dos gêneros *Salmonella* spp e *Shigella* sp.



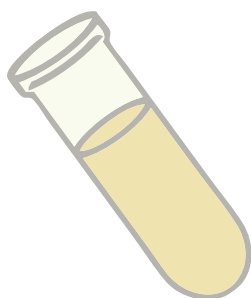
Ágar MacConkey: foi criado para inibir o crescimento de Gram-positivos, e não é tão seletivo para o crescimento de Gram-negativos quanto o Ágar SS. É usado para isolar bacilos Gram-negativos (enterobactérias e não fermentadores) e para evidenciar a fermentação de lactose.



Ágar CLED (Agar Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos: utilizado para isolamento e quantificação de microrganismo Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras procedentes de amostras de urina. Permite a identificação de fermentadores de lactose



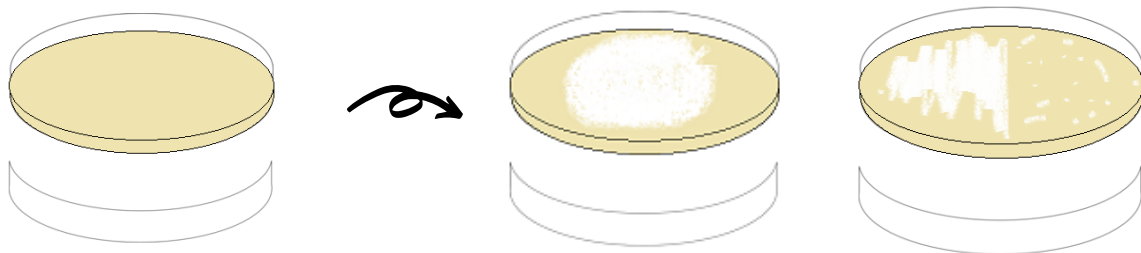
Meio Löwenstein Jensen: este meio é constituído por ovos integrais, sendo utilizado para o crescimento e isolamento de micobactérias. Também apresenta crescimento satisfatório para o teste de niacina, o qual é positivo para *Mycobacterium tuberculosis*.



Caldo Tioglicolato com indicador e sem indicador:

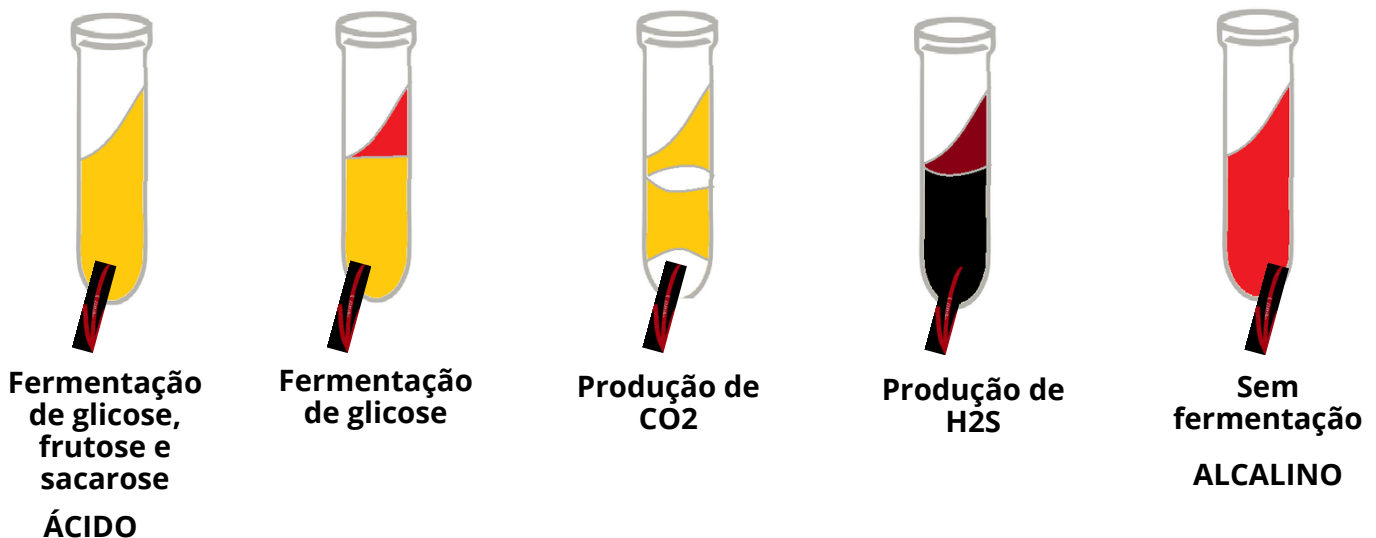
O Caldo Tioglicolato com indicador dá suporte para o crescimento de vários microrganismos, sendo usado para o cultivo de microrganismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios, enquanto o Caldo Tioglicolato sem indicador dá suporte para o crescimento de microrganismos anaeróbios exigentes. O Caldo Tioglicolato com indicador também é usado para o controle de esterilidade bacteriana de vários materiais.

Ágar Sabouraud Dextrose: favorece o crescimento de fungos filamentosos e leveduriformes. É usado para o cultivo e crescimento de *Candida* spp. e fungos filamentosos, particularmente associados a infecções superficiais, além disso, também é utilizado para a caracterização macroscópica de fungos filamentosos.

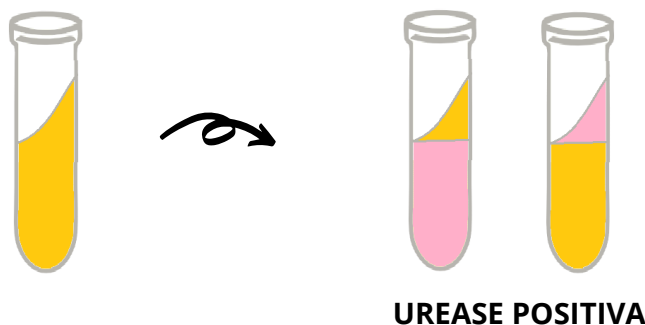


2.3 Meios de Cultura para Provas de Identificação

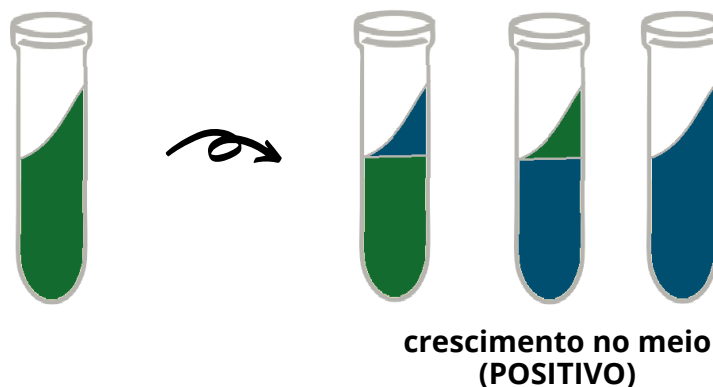
Ágar Açúcar Triplo Ferro (Triple Sugar Iron Agar - TSI): esse meio é composto por três açúcares: 0,1% glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose; além de vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio. A porção inclinada do meio, exposta ao oxigênio, é aeróbia, enquanto a porção inferior, por ser protegida do ar, é relativamente anaeróbia. Assim, o ágar TSI possibilita a diferenciação de bacilos Gram-negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.



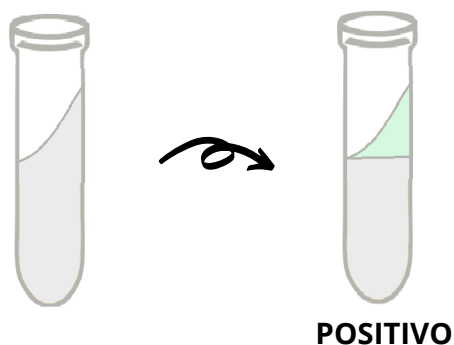
Ágar Base Ureia (Christensen): determina a habilidade da bactéria de degradar a ureia em amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio. Utilizado para diferenciar bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, Staphylococcus e Haemophilus.



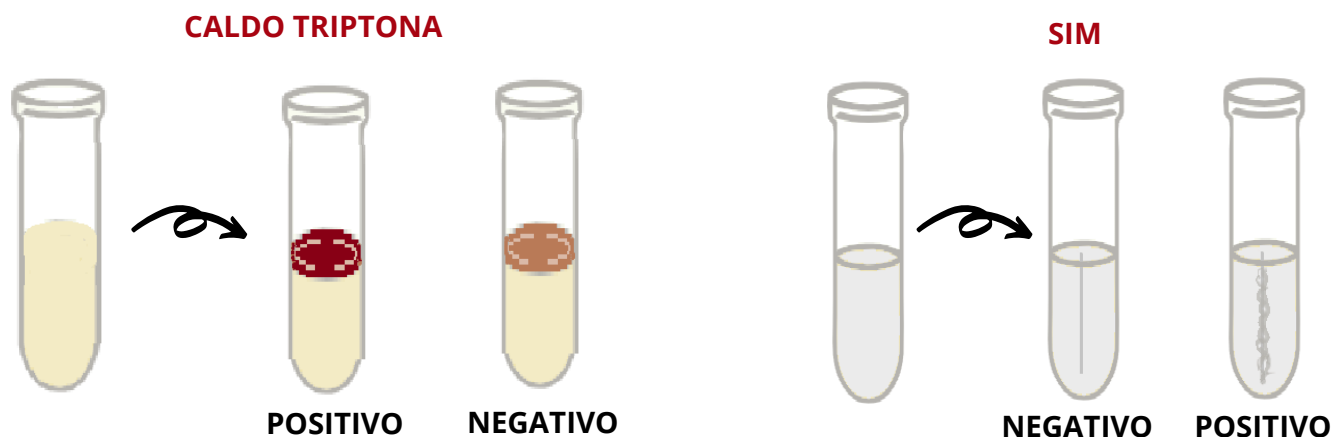
Ágar Citrato de Simmons: determina a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia, alcalinizando o meio. Utilizado para diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.



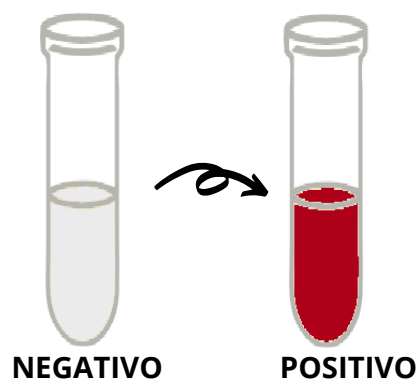
Ágar Fenilalanina: determina a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação enzimática. Utilizado para diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias.



Caldo Triptona e SIM (sulfato/indol/motilidade Ágar): determinam a habilidade da bactéria de metabolizar o triptofano em indol, a partir da adição de reagentes de Erlich ou Kovacs. Com a picada em profundidade, é possível determinar a motilidade bacteriana. Utilizado para diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, *Haemophilus sp* e anaeróbios.

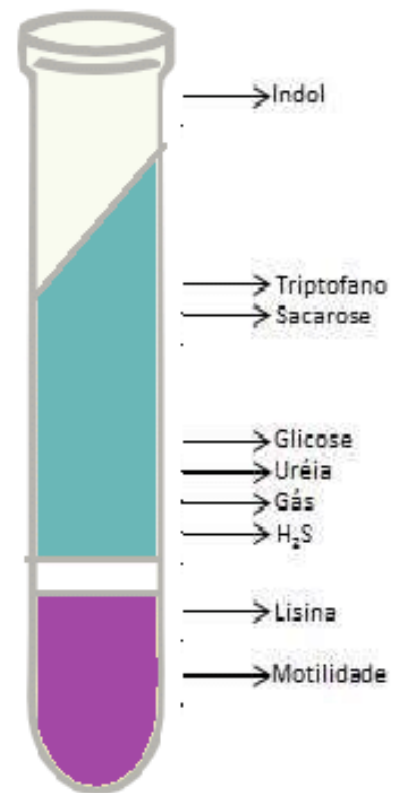


Caldo Nitrato: determina a habilidade da bactéria de reduzir o nitrato a nitrito ou gásnitrogênio (denitrificação). Utilizado para diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, anaeróbios, *Haemophilus sp*, *Neisseria sp* e *Mycobacterium sp*.



Ágar lisina Descarboxilase (LIA): esse meio é composto pelo aminoácido lisina, cujo grupo carboxila reage com as descarboxilases, formando aminas alcalinas. No início da incubação, a glicose contida no meio é fermentada e ocorre viragem de cor púrpura para o amarelo. Quando o aminoácido é descarboxilado, as aminas alcalinas formadas revertem a cor do meio para púrpura original. Assim, é possível verificar a capacidade bacteriana de utilização de enzimas, sendo este meio utilizado principalmente para identificação de enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores e estafilococos.

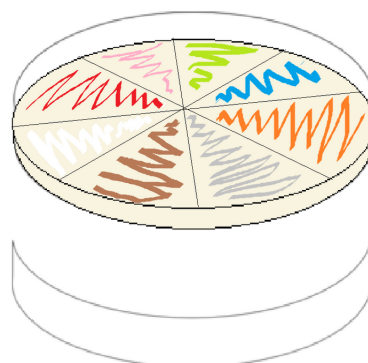
Meio de Rugai com Lisina: é um meio de cultura diferencial destinado à identificação presuntiva de Enterobactérias oxidase negativa. Este meio apresenta uma série bioquímica contendo nove provas que são agrupados em um único tubo: reação de indol, desaminação do aminoácido L-triptofano, fermentação da sacarose, produção de sulfeto de hidrogênio, produção de gás, hidrólise da ureia, fermentação da glicose, descarboxilação da lisina e motilidade.



2.4 Meios Cromogênicos

Os meios cromogênicos foram desenvolvidos com o objetivo de oferecer um método mais rápido e preciso para a detecção de bactérias patogênicas. A detecção é realizada a partir de substratos cromogênicos característicos de cada patógeno, os quais são liberados após a reação de hidrólise, ou seja, cada bactéria é identificada por uma cor específica. Exemplo:

Ágar ChromID® CPS: é um meio de cultura utilizado para isolamento, enumeração e identificação de *E. coli*, *Proteus sp*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp* e *Citrobacter sp* em amostras de urina.





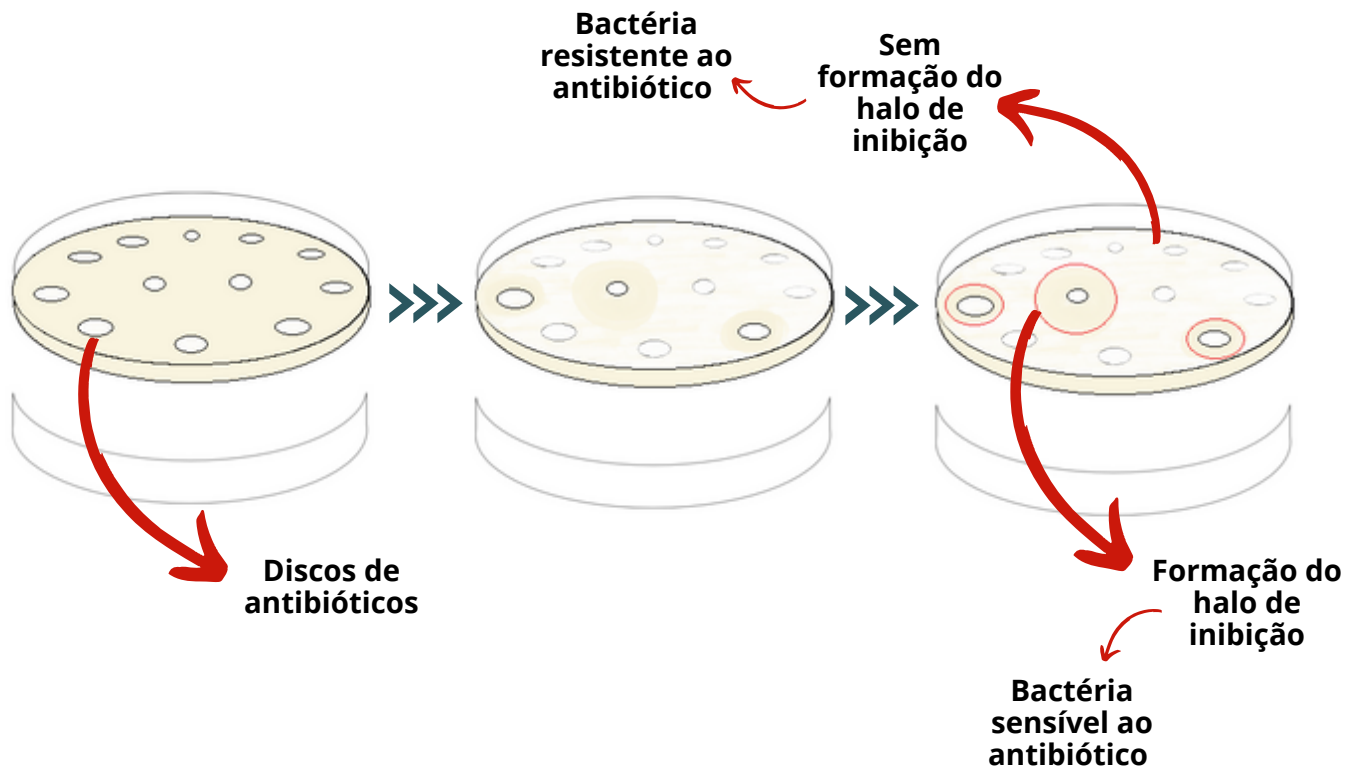
TESTE DO ANTIBIOGRAMA

OBJETIVOS

- Conhecer o teste do antibiograma e entender seu princípio.
- Realizar o teste do antibiograma.
- Identificar o perfil de suscetibilidade bacteriano após o final do teste

1 INTRODUÇÃO

O antibiograma é utilizado para a identificação de bactérias patogênicas, bem como para o teste de suscetibilidade a drogas antimicrobianas as quais a bactéria é sensível ou resistente, determinando também o espectro de ação desses antimicrobianos. Devido ao aumento de microrganismos multiresistentes, o resultado do antibiograma tem sido considerado cada vez mais importante. Existem vários métodos que podem ser utilizados para a execução do antibiograma, são estes: microdiluição, difusão em ágar, gradiente de antimicrobiano e sistemas automatizados. O teste de difusão em ágar é o mais utilizado no Brasil, pois possui baixo custo e boa flexibilidade na seleção dos antimicrobianos. Neste método, são adicionados discos impregnados pelas drogas antimicrobianas à placa de Ágar Mueller Hinton semeada com a suspensão do microrganismo. Após a incubação, é observado se houve a formação de halos de inibição ao redor dos discos. O tamanho do halo indica a sensibilidade do microrganismo ao antimicrobiano.



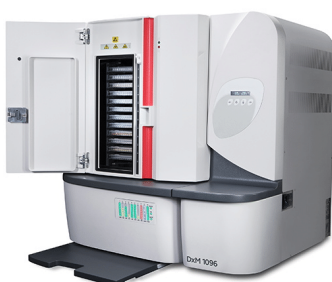
Nos sistemas automatizados, o antibiograma é realizado em cartões ou painéis contendo os antimicrobianos liofilizados. No aparelho é realizada a análise computadorizada do crescimento do microrganismo. Os sistemas mais utilizados no Brasil para a determinação de suscetibilidade aos antimicrobianos são Vitek®, Vitek-2®, Walk-Away® e BD Phoenix®.



Vitek®



Vitek-2®



BD Phoenix®



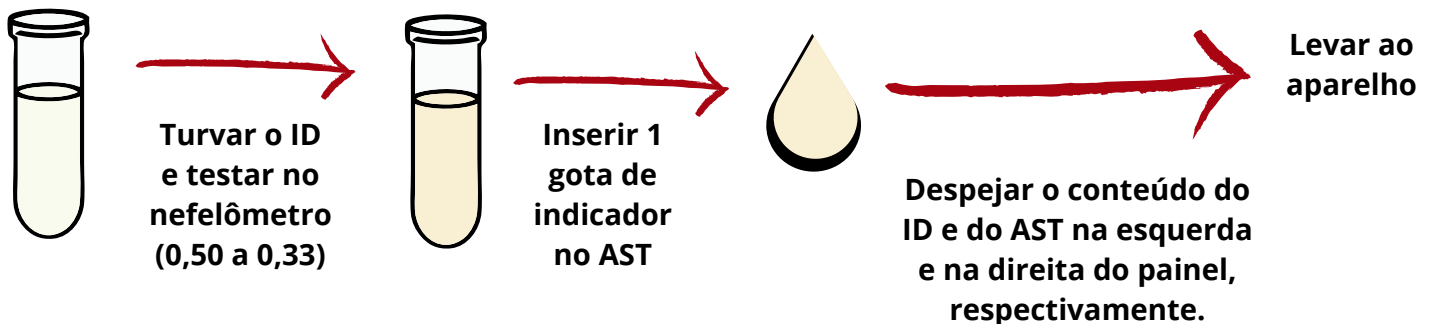
Walk-Away®

3. PROCEDIMENTO TÉCNICO

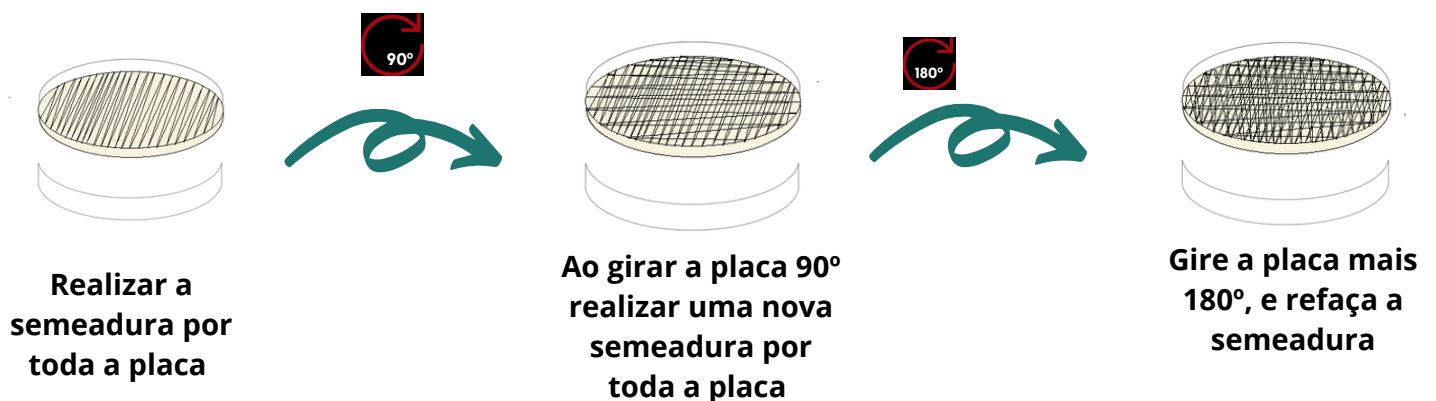
3.1 Equipamentos e materiais necessários

A N T I B I O G R A M A	
M A N U A L	A U T O M A T I Z A D O
<ul style="list-style-type: none"> • Placa com a bactéria a ser analisada; • Solução salina para preparo de suspensão; • <i>Swab</i> e alça de inoculação; • Placar de Ágar Mueller Hinton; • Discos impregnados pelas drogas antimicrobianas; • Estufa bacteriológica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit de reagentes e painéis de antibióticos. • <i>Swab</i> e alça de inoculação. • Nefelômetro. • Pipetas e ponteiras.

Fluxograma automatizado



Fluxograma de semeadura para antibiograma manual





UROCULTURA

CULTURA DA URINA

OBJETIVOS

- Conhecer o procedimento de cultura da urina.
- Realizar o semeio de urocultura.
- Identificar quais bactérias apresentam maior incidência de crescimento em uroculturas positivas.

1. INTRODUÇÃO

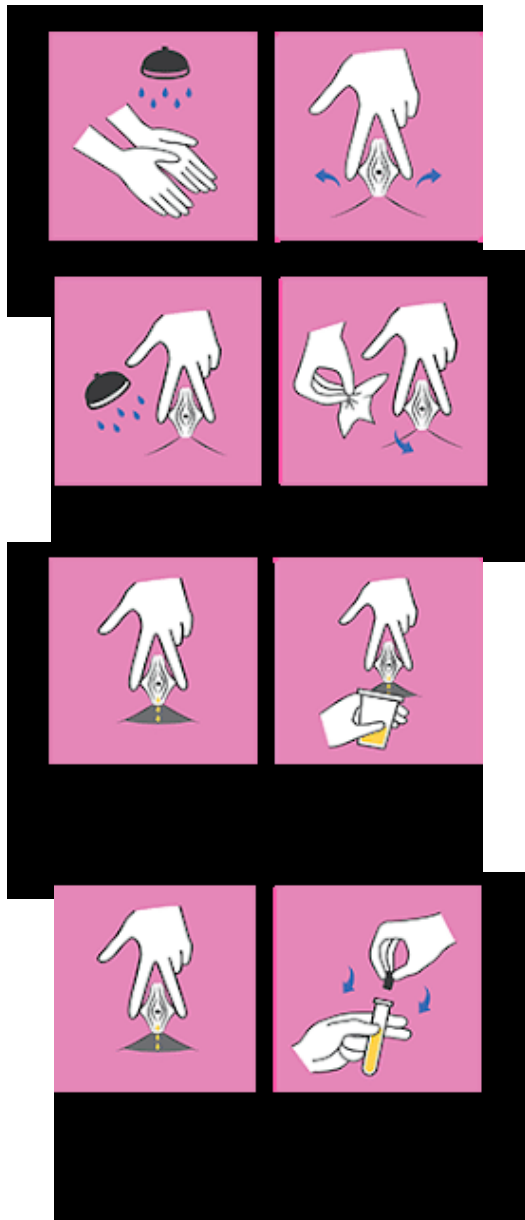
A urocultura é um exame realizado quando há suspeita de infecção do trato urinário. A *Escherichia coli* é a maior causa de infecções do trato urinário, podendo também ocorrer devido a outros microrganismos, como *Enterobacter sp*, *Proteus sp* e *Enterococcus faecalis*.

O paciente deve ser bem instruído acerca da coleta de urina, pois uma má higienização da genitália externa pode gerar contaminação da amostra. Após a higienização, deve ser coletado o jato intermediário de urina. Em casos especiais, a coleta pode ser realizada a partir de punção suprapúbica ou cateterização.



2. Fluxograma da coleta de urina

FEMININA



Esquema de coleta feminina.
 FONTE: OURILABOURILAB -
 Instruções para Coleta.



Lave as mãos.



Exponha a glânde (cabeça) e mantenha o prepúcio (pele) retraído.



Lave o pênis com água e sabão. Enxague em abundância.



Enxugue-o com papel toalha.



Comece a urinar no vaso sanitário.



Sem interromper a micção, pegue o frasco coletor e colete aproximadamente dois dedos de urina.



Despreze o restante de urina no vaso sanitário.



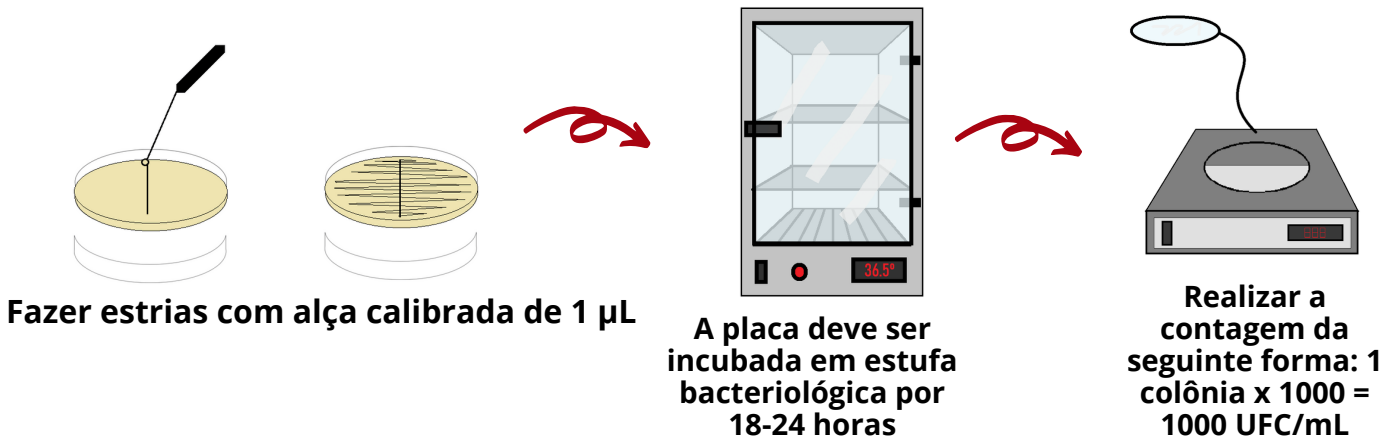
Feche o frasco coletor e leve ao laboratório imediatamente.

MASCULINA

Esquema de coleta masculina.
 FONTE: OURILABOURILAB -
 Instruções para Coleta.

3. PROCEDIMENTO TÉCNICO

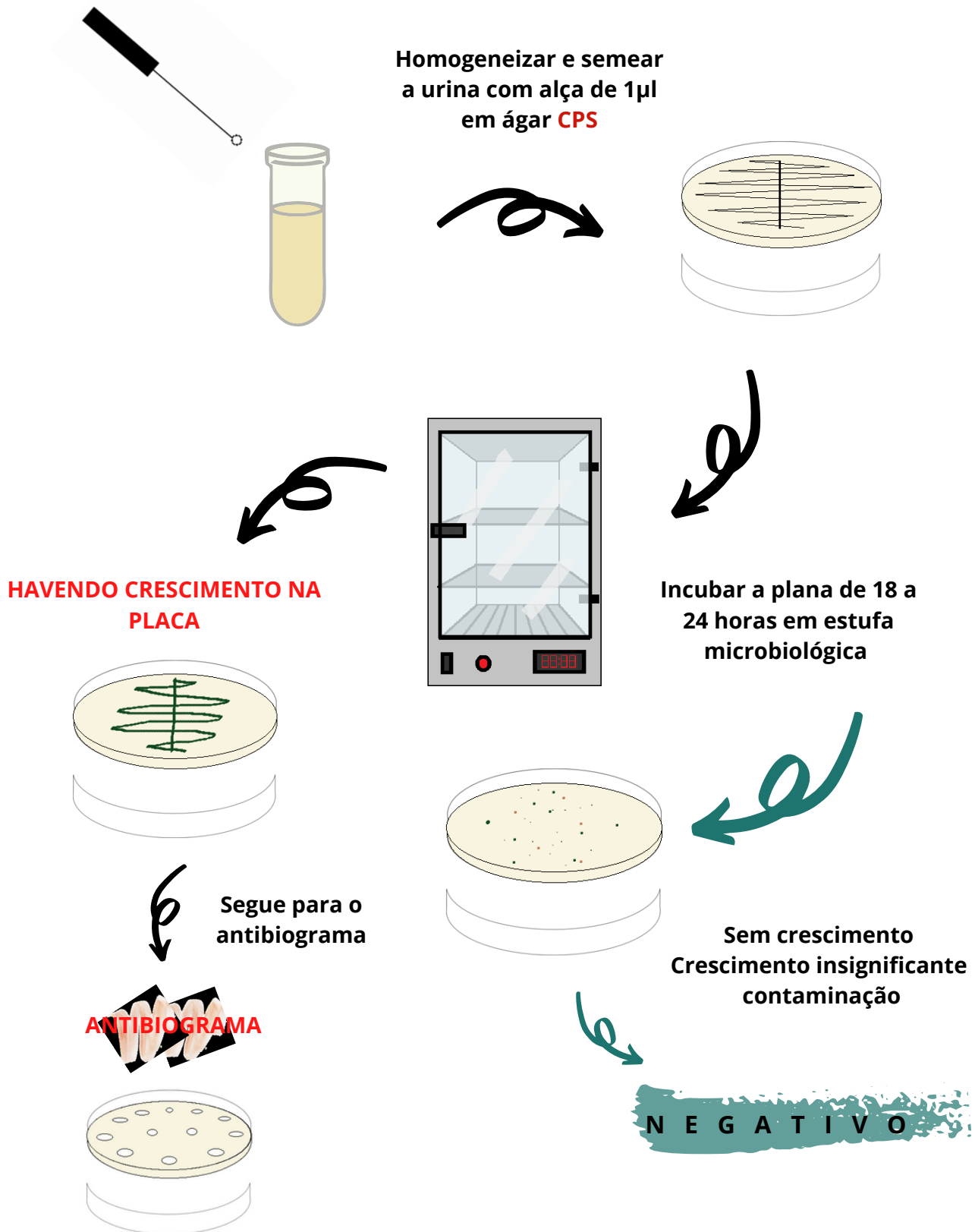
Para o diagnóstico de infecção do trato urinário, existem técnicas quantitativas e semiquantitativas. Em técnicas quantitativas, a contagem bacteriana mínima é de 100.000/mL para uma bacteriúria significativa em pacientes assintomáticos. Já as técnicas semiquantitativas são comparadas a gráficos-padrão, a fim de obter uma estimativa da concentração bacteriana.



A técnica quantitativa consiste em realizar uma estria verticalmente no centro do meio de cultura, seguida de espalhamento do material por meio de estrias com alça calibrada de 1 µL. Em seguida, a placa deve ser incubada em estufa bacteriológica por 18-24 horas. Após esse processo, é realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da seguinte forma: 1 colônia x 1000 = 1000 UFC/mL. Assim, para resultados positivos a contagem deve ser igual ou maior que 100.000 UFC/mL, e para resultados negativos, menor que 100.000 UFC/mL.



4. Fluxograma Urocultura





COPROCULTURA

CULTURA DAS FEZES

OBJETIVOS

- Conhecer o procedimento de cultura das fezes.
- Realizar o semeio da amostra em meios de cultura.
- Identificar quais bactérias apresentam maior incidência de crescimento em coproculturas positivas.

1 INTRODUÇÃO

A cultura de fezes é solicitada geralmente em casos de enterocolite. Os microrganismos mais comumente encontrados nesses casos são as enterobactérias: *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*, além do *Campylobacter* sp.

Os meios de cultura Ágar MacConkey e Ágar Eosina Azul de Metileno são amplamente utilizados na cultura das enterobactérias, pois são meios seletivos e diferenciais, ou seja, inibem o crescimento de Gram-positivos e demonstram a fermentação de lactose. O *Campylobacter jejuni*, por sua vez, é cultivado em meios contendo antibióticos, como o ágar de Skirrow e o AS Campy.



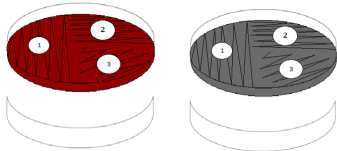
3. PROCEDIMENTO TÉCNICO

O semeio de fezes nos meios de cultura é realizado por esgotamento na superfície da placa. Quando as fezes estão líquidas ou o material foi colhido em *swab*, o semeio deve ocorrer diretamente na placa. Já para amostras sólidas, deve ser feita primeiramente uma diluição da amostra em solução salina, e então, a partir dessa suspensão, o semeio é realizado. Preferencialmente, devem ser escolhidas para o semeio porções das fezes que contenham sangue, muco ou secreção purulenta. Após o semeio, as placas devem ser incubadas por 18-24 horas. Colônias suspeitas devem ser semeadas no meio de Rugai com Lisina, incubadas e interpretadas de acordo com a bula do fabricante. Podem também ser utilizados outros meios para identificação, como Ágar TSI, Citrato de Simmons e Fenilalanina

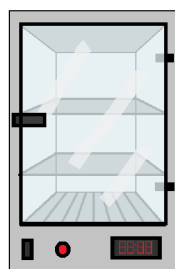
CASO ESPECIAL

ROTINA

Em suspeita de *Campylobacter spp.*, semear em AS Campy ou Karmali.



As placas devem ser incubadas em estufa bacteriológica por 48-72 horas, em 24 °C

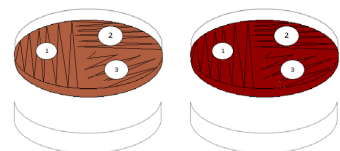


Havendo crescimento em placa, realizar identificação.

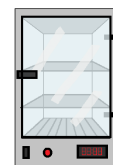
Com a alça de 10 µl tocar em vários pontos da amostra de fezes.



Semear em ágar MacConkey e ágar SS



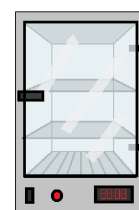
As placas devem ser incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, em 35°C



Semear colônias suspeitas no meio Rugai



As placas devem ser incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, em 35°C



REPORTAR RESULTADO

SOROAGLUTINAÇÃO



HEMOCULTURA

CULTURA DO SANGUE

OBJETIVOS

- Conhecer o procedimento da cultura de sangue.
- Realizar o semeio de hemocultura positiva.
- Identificar quais bactérias apresentam maior incidência de crescimento em hemoculturas positivas.

1 INTRODUÇÃO

As hemoculturas são solicitadas principalmente quando há suspeita de sepse, endocardite, osteomielite, meningite ou pneumonia. Em hemoculturas positivas são isolados com frequência *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Recomenda-se que sejam coletadas três amostras de 10 mL de sangue do paciente em um período de 24 horas, visto que pode haver um baixo número de microrganismos, além da possibilidade de sua presença ser intermitente. Antes da coleta, é fundamental que o sítio da punção seja limpo com iodo a 2%, a fim de evitar a contaminação da cultura pela microbiota normal da pele. Após a coleta, o sangue é inoculado em um frasco contendo um meio rico, como caldo infusão de cérebro-coração, permanecendo incubado por cerca de sete dias.

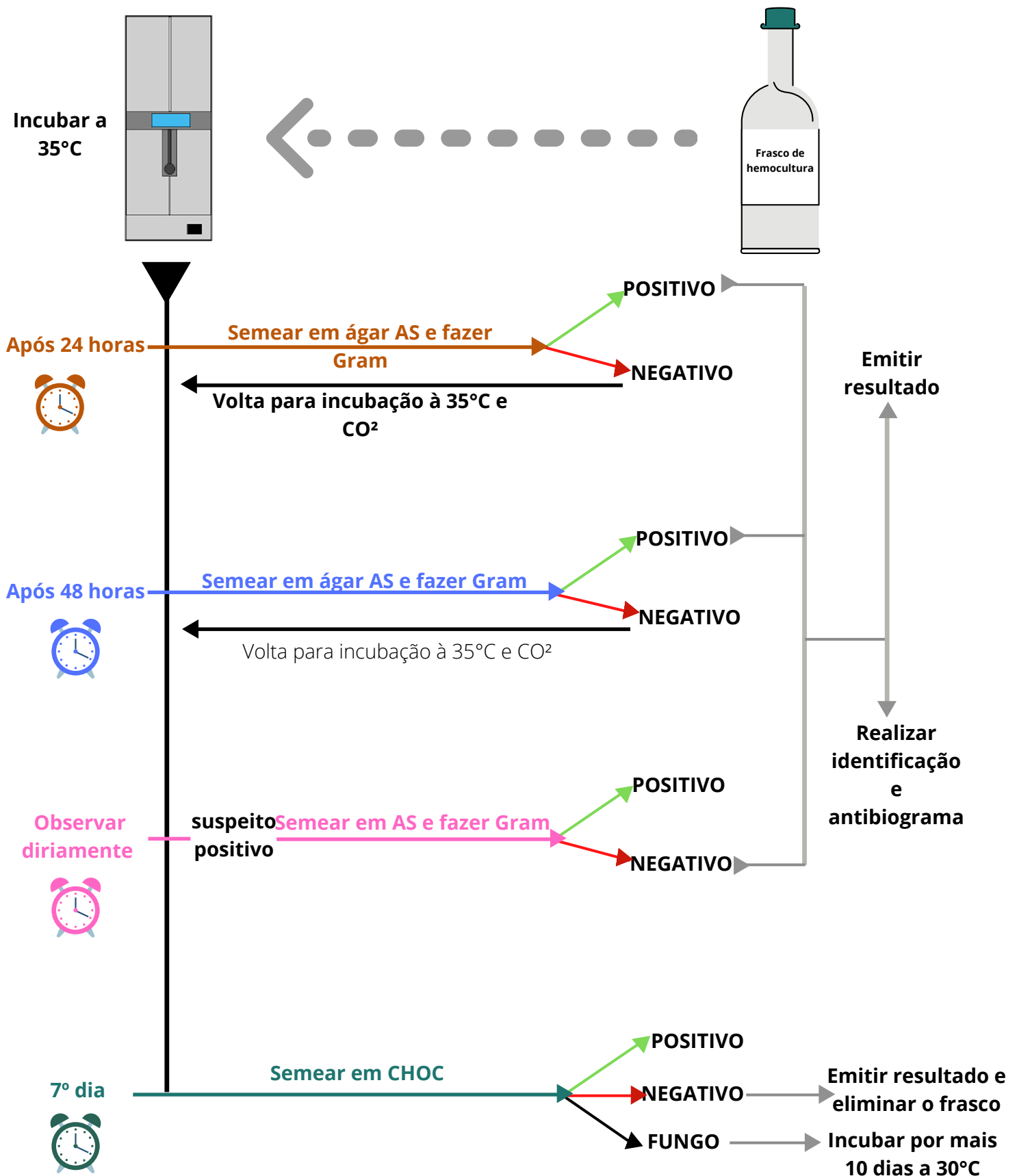
2. PROCEDIMENTO TÉCNICO

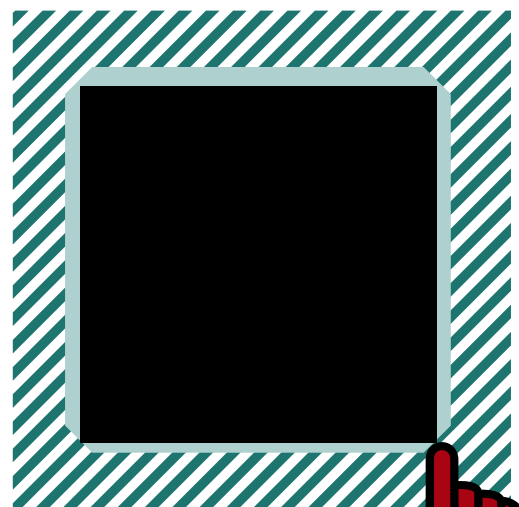
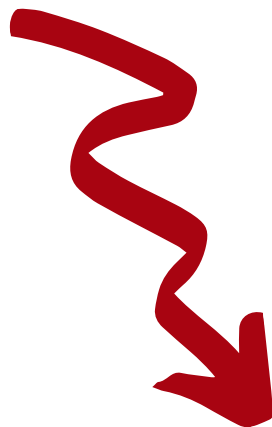
A hemocultura pode ser realizada manualmente ou de forma automatizada. Na hemocultura manual, o responsável pela bancada deve verificar diariamente os frascos de hemocultura, semear a amostra em placa de Ágar Sangue e confeccionar esfregaço para análise microscópica da morfologia bacteriana e de suas propriedades tintoriais a partir da coloração de Gram. Essa análise permite a emissão de laudo parcial, até que seja liberado o resultado do antibiograma, realizado com as colônias que apresentarem crescimento no Ágar Sangue.

Quanto à hemocultura automatizada, existem diversos sistemas automatizados utilizados na incubação de hemoculturas, como o **BD BACTEC™** e o **BD BACTEC™ FX**, que além de incubar, monitoram e agitam os frascos. Assim, o aparelho realiza a detecção de amostras positivas, as quais devem passar pelo mesmo procedimento da hemocultura manual, ou seja, deve ser realizado o semeio em Ágar Sangue e a análise de esfregaço da amostra após coloração de Gram, bem como a liberação de laudo parcial e o antibiograma das colônias que crescerem após a incubação da placa.



3. PROCEDIMENTO TÉCNICO





- BD. **BD BACTEC^{13M}: Hemocultura Automatizada**. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/blood-culture/bactec>. Acesso em: 15 out. 2020.
- BIOMÉRIEUX. **Meio de cultura cromogênico**. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/veterinaria/meio-de-cultura-cromogenico>. Acesso em: 28 abr. 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: ANVISA, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia**. 3. ed. Brasília: SVS/ Ministério da Saúde, 2006.
- ISO/TS 11133-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory**. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2009.
- KASVI. **Meios Cromogênicos: a próxima geração de meios de cultura**. Disponível em: <https://kasvi.com.br/meios-cromogenicos-a-proxima-geracao-de-meios-de-cultura/#:~:text=A%20maioria%20dos%20meios%20cromog%C3%AAnicos,sua%20diferencia%C3%A7%C3%A3o%20baseado%20em%20cores>. Acesso em: 30 set. 2020.
- LABORCLIN. **Meio de Rugai com Lisina**. Disponível em: https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/meio_de_rugai_com_lisina_510102_2.pdf. Acesso em: 15 out. 2020.
- LABORCLIN. **Urilab**. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/urilab/>. Acesso em 13 nov. 2020.
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.S
- OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 2010.
- OKURA, M.H.; RENDE, J.C. **Microbiologia: Roteiros de Aulas Práticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2008.
- PROCOP, W. G.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- RIBEIRO, M.C.; STELATO, M.M. **Microbiologia Prática: Aplicações de Aprendizagem de Microbiologia Básica - bactérias, fungos e vírus**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): boas práticas em microbiologia clínica**. Barueri, SP: Manole, 2015.
- TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.



Microbiologia

CRÉDITOS EDITORIAIS

Título:

Guia Prático de Orientações Básicas de Microbiologia

Autores:

Andresa Corrêa Pinto

Karla Tereza Silva Ribeiro

Revisão Científica:

Andresa Corrêa Pinto

Karla Tereza Silva Ribeiro

Contato com a Autora:

correaandresa25@gmail.com

Projeto Gráfico e Edição de Arte:

Mayara Nerina Fortes Arthur - mayaranerina@gmail.com

Produção de Mídia

Jhonny Pereira Feitoza - jhonnyfeitoza10@gmail.com

Guia Prático de Orientações Básicas de



Microbiologia

