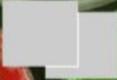


ADJANNY ESTELA SANTOS DE SOUZA
ALDINE CECÍLIA LIMA COELHO

MICROBIOLOGIA

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS



editora
itacaiúnas

ADJANNY ESTELA SANTOS DE SOUZA

ALDINE CECÍLIA LIMA COELHO

MICROBIOLOGIA

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS



Fonte: <http://respiramosnatureza.blogspot.com.br/2015/04/bacterias.html>

© 2017 by Adjanny de Souza e Aldine Coelho
Todos os direitos reservados.

***Capa, projeto gráfico e
diagramação***
Itacaiúnas Comércio e Serviços

Editor de publicações
Walter Rodrigues

Conselho editorial
Colaboradores:
Viviane Corrêa Santos
Márcia Aparecida da Silva Pimentel
Josimar dos Santos Medeiros
Luis Fernando Cardoso e Cardoso

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S719m

Souza, Adjanny Estela Santos de
Microbiologia: roteiro de aulas práticas [livro
eletrônico]/ Adjanny Estela Santos de Souza e
Aldine Cecília Lima Coelho – 1.Ed. – Ananindeua:
Itacaiúnas, 2017.

69p. il: PDF

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-9535-016-8

1. Biologia 2. Ciências da vida 3. Microbiologia.
4. Práticas pedagógicas I. Título.

CDD-570

*O conteúdo desta obra é de responsabilidade de seus
respectivos autores, detentores dos Direitos Autorais.*

Sumário

MICROBIOLOGIA: HISTÓRICO, CONCEITO E IMPORTÂNCIA.....	5
NORMAS DE BIOSSEGURANÇA ADOTADAS EM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	9
EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS EM MICROBIOLOGIA:NOÇÕES GERAIS DE MICROSCOPIA	11
MORFOLOGIA BACTERIANA	16
EXAME BACTERIOSCÓPICO - COLORAÇÃO DE GRAM	19
ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO.....	23
ANTISSEPZIA DAS MÃOS	26
COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS DESTINADOS AO EXAME MICROBIOLÓGICO.....	28
ANTIBIOGRAMA.....	43
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus</i>	51
COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E HANSENÍASE	55
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS.....	59
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AGENTE DE INFECÇÕES URINÁRIAS	66

MICROBIOLOGIA: HISTÓRICO, CONCEITO E IMPORTÂNCIA

1. Histórico

Os Cientistas deduziram que os micro-organismos originaram-se há 4 bilhões de anos, e são considerados ancestrais de todas as outras formas de vida, de acordo com os primeiros indícios de vida na terra.

Embora os micro-organismos sejam antigos, a microbiologia é uma ciência jovem. Parece inacreditável que os pesquisadores tenham observado os micro-organismos pela primeira vez somente há 300 anos, e que estes tenham sido tão pouco compreendidos durante muitos anos após a sua descoberta. Existe um período de quase 200 anos a partir das primeiras observações até o reconhecimento de sua importância.

Em meio a muitas tentativas científicas de se obter novos conhecimentos sobre micro-organismos, algumas podem ser mencionadas por terem contribuído mais intensamente ao reconhecimento da microbiologia como ciência. A primeira delas surgiu na segunda metade do século XIX, quando os cientistas provaram que os micro-organismos originaram-se de pais iguais a eles próprios e não de causas sobrenaturais ou de plantas e animais em putrefação. Mais tarde, os cientistas provaram que os micróbios não são o

resultado, mais sim a causa de processos fermentativos no suco de uva para a produção de vinho. Eles também descobriram que um tipo específico de micróbio causa uma doença específica. Estas informações foram o início do reconhecimento e da compreensão da influência crítica destas “novas” formas de vida sobre a saúde e o bem estar do homem. Durante o início do século XX, os microbiologistas aprenderam que os micro-organismos são capazes de realizar uma grande variedade de reações químicas, aquelas que envolvem a quebra de substâncias ou síntese de novos compostos. O termo diversidade bioquímica foi criado para caracterizar os micro-organismos. Igualmente importante foi a observação de que o mecanismo pelo qual estas reações químicas são produzidas pelos micro-organismos é muito semelhante àquela que ocorre em formas de vida superiores.

2. Conceito

Microbiologia é o estudo de organismos microscópicos; tal denominação deriva de três palavras gregas: *micros* (pequeno), *bios* (vida) e *logos* (ciência). Assim, a microbiologia significa o estudo da vida microscópica.

3. Importância

Durante as últimas décadas, os micro-organismos têm surgido como parte do eixo principal das ciências biológicas. Entre as razões para isto, está o conceito de “unidade em bioquímica”, que significa que muitos dos processos bioquímicos que ocorrem em micro-organismos são

essencialmente os mesmos em todas as formas de vida, inclusive no homem.

Os micro-organismos têm também emergido como novas fontes de produtos e processos para benefício da sociedade. Por exemplo, novas variedades de micro-organismos produzidos por engenharia genética podem produzir substâncias medicinais importantes, tais como a insulina humana. Durante anos, somente a insulina bovina, extraída do pâncreas de bezerro era disponível para o tratamento do diabetes, e alguns pacientes não podiam utilizá-la. Hoje a insulina humana pode ser produzida em quantidades ilimitadas por uma bactéria geneticamente construída. Os micro-organismos têm um grande potencial para ajudar na limpeza do ambiente: da decomposição de componentes de petróleo em derramamento de óleos à decomposição de herbicidas e inseticidas usados na agricultura. Variedades específicas de micro-organismos estão em uso e outras sendo desenvolvidas para substituir substâncias químicas atualmente utilizadas para o controle de insetos. A habilidade para construir geneticamente micro-organismos para finalidades específicas criou um novo campo da microbiologia industrial, a biotecnologia.

Em relação as ciências da saúde, a microbiologia é igualmente importante, pois sabemos que muitos agravos à saúde humana e dos animais são causados por micro-organismos, para sabermos prevenir e tratar esses agravos, precisamos conhecer os seus agentes e os mecanismos pelos quais estes causam doenças.

O estudo da microbiologia nos permite aprender e apreciar o mundo invisível das bactérias, algas, fungos, protozoários e vírus. Alguns são responsáveis pela deterioração

de tecidos, madeiras e metais. Outros são agentes etiológicos de doenças. Entretanto, muitos deles (a maioria) são importantes pois realizam alterações no ambiente que são essenciais para a manutenção da vida, como nós a conhecemos, no planeta terra. E há ainda outros micro-organismos que são explorados para produzir uma variedade de substâncias químicas utilizadas na indústria.

NORMAS DE BIOSSEGURANÇA ADOTADAS EM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

1. Introdução

Devemos considerar todo laboratório de microbiologia como área de risco biológico. Os riscos em um laboratório de microbiologia estão representados, principalmente, pela manipulação de grande número de micro-organismos, alguns sendo agentes potencialmente patogênicos e pelo manuseio com substâncias químicas ou radioativas.

Embora a preocupação principal seja com profissionais que manipulam amostras biológicas no laboratório, é importante reconhecer que existe um risco também para indivíduos que não trabalham habitualmente no laboratório, mas que podem ter acesso a ele ocasionalmente, ou para os que se encontram em uma área próxima.

As principais fontes de infecções no laboratório de microbiologia são os aerossóis, gotículas que se formam pelo esguicho de líquidos com a pipeta, pelo vibrar da alça de platina ou pela evaporação brusca de uma suspensão, que podem carrear micro-organismos para o ambiente. Essas gotículas permanecem suspensas no ar por longos períodos e podem, ocasionalmente, ser inaladas ou se depositarem em mucosas causando infecções. O emprego correto das técnicas de assepsia e de manuseio dos equipamentos evitará contaminações no ambiente ou do manipulador.

As aulas práticas de microbiologia têm como objetivo ensinar ao estudante os princípios e métodos utilizados em um laboratório de microbiologia. Nessas aulas trabalharemos com uma variedade de bactérias, algumas patogênicas para o homem. Portanto, é essencial seguir as normas de segurança estabelecidas para um laboratório, a fim de se evitar contaminação.

2. Principais normas a serem seguidas em laboratório de microbiologia

- Desinfete a bancada de trabalho no início e término e cada aula prática;
- Não coma no laboratório;
- Use sempre avental ou jaleco;
- Antes do início de cada operação certifique-se de que todo o material que vai precisar esteja ao seu alcance;
- Lave as mãos ao sair do laboratório e sempre que suspeitar de contaminação;
- Avise ao professor em caso de contaminação acidental;
- Não coloque materiais contaminados na bancada;
- Siga as normas de uso dos equipamentos. O microscópio é um instrumento de trabalho valioso e deve ser manipulado cuidadosamente;
- Cuidado ao acender o bico de Bunsen ou lamparinas. Verifique se não existem substâncias inflamáveis por perto;
- Flambe as alças, agulhas e pinças antes e após o uso.

Lembre-se, que o laboratório é um local de trabalho e aprendizagem, mas é também um local de risco biológico. Portanto, leve a sério suas tarefas.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS EM MICROBIOLOGIA: NOÇÕES GERAIS DE MICROSCOPIA

1. Equipamentos e Materiais

- Autoclave
- Alças e agulhas para
semeadura
- Balança analítica
- Algodão
- Banho-Maria
- Álcool e desinfetante
- Bico de Bunsen
- Contador de colônias
- Óleo de imersão
- Destilador de água
- Papel absorvente
- Estufa de bacteriológica
- Pinças
- Estufa de secagem e
esterilização
- Swabs
- Jarra para anaerobiose e
microaerofilia
- pHmetro
- Microscópio óptico
- Fita crepe
- Lamparina
- Corantes
- Câmara de fluxo laminar
- Estante para tubos
- Centrífuga
- Meios de cultura
desidratados
- Refrigerador

2. Vidrarias

- Balão de fundo chato
- Bastão de vidro
- Becker
- Erlenmeyer
- Frascos conta-gotas
- Funil
- Gral e pistilo
- Kitasato
- Lâminas
- Lamínulas
- Pipeta volumétrica, graduada, Pasteur
- Placa de Petri
- Proveta
- Tubo de ensaio

3. Noções de microscopia

A observação de bactérias é sempre feita com objetiva de imersão (100x), havendo aumento final do objeto de 1000x.

Inicialmente focalize o esfregaço com as objetivas de menor aumento (10x), depois coloque uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e focalize com a objetiva de imersão. O diafragma deverá estar aberto para uma boa iluminação.

Ao término da aula, limpe a objetiva de imersão com papel absorvente (não usar álcool). Cuidado para não sujar demais objetivas com óleo.



Fig. 02: Microscópio óptico

Fonte: <http://biocelunb.blogspot.com.br/2011/05/visualizacao-de-celulas-ao-microscopio.html>

MORFOLOGIA BACTERIANA

1. Introdução

As bactérias são seres microscópios. Algumas podem ter um diâmetro entre 35 e 40 μm (micrômetro) e vários centímetros de comprimento (sulfobactérias aquáticas) e, outras são bem menores tendo em média 0,3 μm de comprimento.

As células bacterianas são caracterizadas morfológicamente pelo seu tamanho, forma, arranjo e estruturas que apresentam.

1. Tipos morfológicos e arranjos

1.1 **Cocos:** são bactérias de formato esférico, que podem apresentar os seguintes arranjos:

- a) **Diplococos:** cocos agrupados aos pares.
 - Gonococos: apresentam a forma de rins ou grãos de feijão.
 - Pneumococos: apresentam a forma de lança ou chama de vela.
- b) **Streptococos:** cocos agrupados em cadeia.
- c) **Estafilococos:** cocos agrupados em cacho.
- d) **Tétrade ou tetradas:** cocos agrupados em quatro.

e) **Sarcina**: cocos em grupos de oito, em configuração de um cubo.

2.2. **Bacilos ou bastonetes**: são bactérias em forma de pequenos bastões, com as extremidades arredondadas ou retas, ocasionalmente podem ocorrer arranjos:

a) **Diplobacilos**: bacilos aos pares.

b) **Estreptobacilos**: bacilos em cadeia.

***Cocobacilos**: é uma forma intermediária, correspondem à bacilos curtos que se assemelham aos cocos.

2.3. **Espirilos**: são bactérias curvas ou filamentos espiralados.

a) **Espirilos propriamente ditos**: possuem o corpo ondulado, rígido e se movimentam por flagelos.

b) **Espiroquetas**: possuem o corpo em espiral flácido e se movimentam por contração de um filamento interno.

2.4. **Vibriões**: são bacilos encurvados que se assemelham a vírgulas.

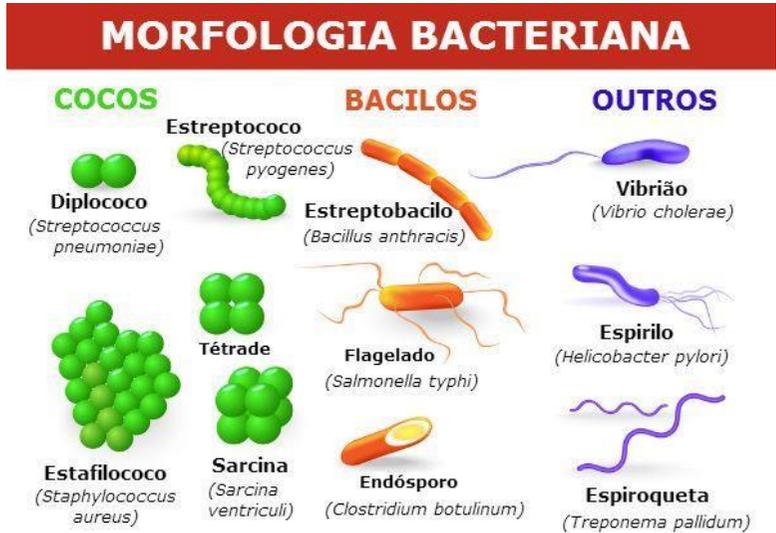
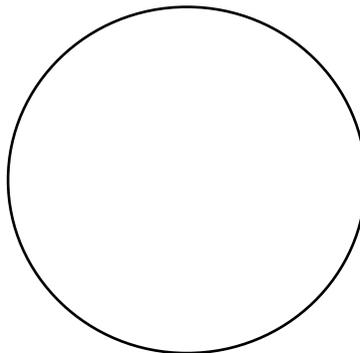


Fig 03: Morfologia bacteriana. Fonte: todamateria.com.br/bacterias/

2. Esquema das observações microscópicas realizadas



EXAME BACTERIOSCÓPICO - COLORAÇÃO DE GRAM

A bacterioscopia é o método mais comum utilizado para a detecção de micro-organismos diretamente de amostras biológicas e para melhor caracterização morfofuntorial dos micro-organismos isolados em cultura. Para o diagnóstico microbiológico a observação deverá ser realizada após coloração, e umas das técnicas mais utilizadas com esta finalidade é a coloração de Gram.

Método de coloração de Gram (Christian Gram, 1884)

1. Princípio

As bactérias são Gram positivas ou Gram negativas de acordo com as diferenças de composição e a estrutura da parede celular. As bactérias Gram positivas possuem uma parede espessa de peptidoglicano e grandes quantidades de ácido teicóico, o qual retém o corante inicial (cristal violeta), não sendo afetada pela descoloração com álcool-acetona, com isso as células aparecem azul-escuro. As bactérias Gram negativas possuem uma parede celular constituída de uma camada delgada de peptidoglicano que permite a descoloração do cristal violeta com álcool-acetona e posterior coloração com o corante de fundo fucsina (vermelho).

2. Material biológico

Amostras recebidas em “swabs”, amostras após aspiração, biópsias, tecidos, líquidos e matérias orgânicos em geral e cultivos bacterianos.

3. Preparação do esfregaço

Matérias líquidas deverão ser submetidos à centrifugação (3.000 a 5.000 rpm/ 15 min), para obtenção do sedimento com o qual será realizado o esfregaço. Biópsias e tecidos deverão ser fragmentados com auxílio de um bisturi em lâmina. Cultivos em meios sólidos deverão ser emulsionados em lâmina com uma gota de solução salina.

3.1. Etapas

a) **Distensão do material:** é feito com alça de platina ou swab, através de movimentos circulares e elípticos com cuidado para não tocar as extremidades da lâmina. As lâminas devem ser secas, desengorduradas e sem riscos.

b) **Secagem:** é realizado deixando que a preparação seque naturalmente ao ar ou em estufa regulada a temperatura de 37°C, ou colocando a lâmina próximo ao bico de Bunsen.

c) **Fixação:** antes de se fazer agir os corantes é necessário fixar o esfregaço sobre lâmina, para que o material fique aderido à lâmina. O método utilizado é a fixação pelo calor que consiste em passar a lâmina com o esfregaço sobre a chama do bico de Bunsen.

4. Técnica de coloração de Gram

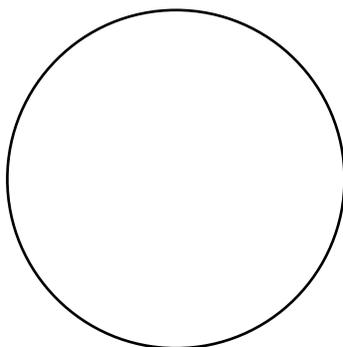
1. Cobrir o esfregaço com Violeta de Genciana (corante principal) - 1 a 2 minutos;
2. Desprezar o corante;
3. Cobrir o esfregaço com lugol (adjuvante ou mordente) - 1 a 2 minutos;
4. Lavar com água corrente;
5. Descorar com álcool-acetona (diferenciador), até que não escorra mais violeta (cuidado para não descorar demais);
6. Lavar com água corrente;
7. Cobrir o esfregaço com fucsina por 30 segundos.
8. Lavar com água corrente, secar e observar ao microscópio com objetiva de 100 x.

5. Diagnóstico (Resultado)

Analisar várias áreas do esfregaço, verificando a presença de leucócitos (piócitos), células epiteliais e bactérias. Relatar essas observações. Em relações às bactérias o diagnóstico deverá ser feito de acordo com os seguintes critérios:

- Forma;
- Propriedade tintorial;
- Grupamento (arranjos);
- Semelhança.

Observações realizadas/Diagnóstico



ESTERILIZAÇÃO E DESINFECCÃO

1. Introdução

Os principais objetivos do controle de populações de micro-organismos, são:

- Prevenir a transmissão de doenças e infecções;
- Prevenir a contaminação ou crescimento de micro-organismos patogênicos;
- Prevenir a deterioração e danos de materiais por micro-organismos.

Os micro-organismos podem ser removidos, inibidos ou mortos por agentes físicos e/ou químicos, utilizando-se uma grande variedade de técnicas e de agentes, que agem de modos diferentes e com seu limite de aplicação.

2. Definição de termos

2.1 **Esterilização:** processo de destruição por meio de agentes físicos ou químicos de todas as formas de vida microscópica.

2.2 **Desinfecção:** processo que consiste na destruição, remoção ou redução dos micro-organismos presentes num material inanimado através do uso de agentes químicos. A desinfecção não implica na eliminação de todos os micro-organismos viáveis, porém elimina a potencialidade infecciosa do objeto, superfícies ou local tratado. O agente empregado é denominado desinfetante.

2.3 **Assepsia:** Conjunto de meios usados para impedir a penetração de micro-organismos, em local que não os contenha.

2.4 **Antissepsia:** consiste no mesmo conceito dado à desinfecção, porém está relacionado com substâncias aplicadas ao organismo humano, é a redução do número de micro-organismos viáveis na pele pelo uso de uma substância denominada de antisséptico.

2.5 **Bactericida:** é um agente que mata bactérias, isto é, determina a perda irreversível da capacidade de reprodução.

2.6 **Bacteriostático:** é uma agente que tem a capacidade de inibir a multiplicação de micro-organismos.

3. Métodos utilizados no controle de micro-organismos

3.1 Métodos físicos

3.1.1 Calor seco

- a) Flambagem em chama direta: bico de Bunsen
- b) Incineração: materiais a serem descartados
- c) Forno Pasteur (Esterilização): 160-180 °C/ 1-2 h

3.1.2. Calor úmido

- a) Pasteurização: lenta (62.8°C/30 min.), rápida (71, 7°C/15 min)
- b) Água fervente: 100°C
- c) Vapor fluente
- d) Autoclavação: 121°C/15 a 20 min.

3.1.3. Radiações

- a) De feixes eletrônicos: raios catódicos

b) Ionizantes: raios gama e raio γ

c) Não ionizantes: raios ultravioleta

d) Micro-ondas

3.1.4. Filtração

3.2. Métodos Químicos

a) Fenóis e derivados: fenol, cresol, ácido salicílico e ácido benzóico.

b) Álcoois: metílico, etílico, butílico e propílico

c) Halogênios: iodo, cloro

d) Metais pesados: mercúrio, prata, cobre

e) Corantes: verde brilhante, cristal violeta, derivados da acridina.

f) Detergentes sintéticos: laurilsulfato de sódio

g) Oxidantes: peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio

h) Ácidos e álcalis: ácido sulfúrico, ácido clorídrico, hidróxido de sódio

i) Esterilizantes gasosos: óxido de etileno

j) Glutaraldéido

ANTISSEPZIA DAS MÃOS

1. Introdução

A microbiota das mãos apresentam uma população de micro-organismos representada por diferentes gêneros e uma diversidade muito grande de indivíduo para indivíduo e em um mesmo indivíduo de um momento a outro. Estes micro-organismos podem ser distribuídos em dois grupos:

- **Microbiota residente:** consiste em tipos relativamente fixos de micro-organismos encontrados com regularidade numa determinada área, em determinada idade, quando alterada ela prontamente se recompõem.

- **Microbiota transitória:** consistem em micro-organismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos, que habitam a pele ou as mucosas durante horas, semanas; é originária do meio ambiente, não produz doença e não se estabelece de modo permanente na superfície do corpo.

- Os membros da microbiota transitória são geralmente de pouca importância, desde que a microbiota residente normal permaneça íntegra. Entretanto se a microbiota residente for alterada, micro-organismos transitórios podem proliferar e produzir doenças.

Com a finalidade de reduzir a microbiota transitória, o profissional da área de saúde (médico, farmacêutico, biomédico, enfermeiro, dentista, etc.) ao entender um paciente, utiliza a lavagem das mãos com água e sabão e as vezes com antissépticos.

Nos hospitais a lavagem das mãos deve ser um procedimento fundamental entre as medidas que se destinam ao controle das infecções hospitalares. A importância desta operação pode ser facilmente demonstrada no laboratório através do controle da microbiota das mãos, pela utilização de agentes físicos e químicos.

2. Roteiro da prática

- 2.1 Utilizar 3 placas de Petri contendo ágar nutriente (meio de cultura básico) e identificar com nome do operador e os números 1, 2 e 3 cada uma;
- 2.2 Tocar os dedos da mão direita na placa 1 (sem lavar);
- 2.3 Lavar as mãos com água e sabão e enxugá-las com uma gaze previamente esterilizada;
- 2.4 Tocar os dedos da mão direita na placa 2;
- 2.5 Lavar novamente as mãos com uma solução antisséptica (álcool iodado) e enxugá-las em outra gaze previamente esterilizada;
- 2.6 Tocar os dedos da mão direita na placa 3;
- 2.7 Levar as placas à estufa a 35-37°C, invertidas e incubar durante 24-48 horas;
- 2.8 Efetuar a leitura e a interpretação dos resultados.

PROCEDIMENTO	PLACAS	No. DE COLÔNIAS (UFC)
Mãos sem lavar	01	
Mãos lavadas com água e sabão	02	
Mãos lavadas com água, sabão e álcool iodado	03	

COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS DESTINADOS AO EXAME MICROBIOLÓGICO

1. Urina

- Exame: Cultura de urina ou urocultura
- Objetivo: Diagnóstico de infecções do trato urinário (ITU).

1.1. Jato médio: indica-se colher o jato médio da primeira ruina da manhã, efetuando-se, previamente, uma lavagem cuidadosa, com água e sabão na região perineal e utilização de recipientes previamente estéreis. As amostras deverão ser processadas de imediato após a coleta, poderão ser mantidas sob refrigeração até um período máximo de 24 horas.

1.2. Punção supra púbica: a urina é retirada diretamente da bexiga, através de punção com seringa e agulha, após assepsia rigorosa do local. Este procedimento é recomendado em casos de pacientes com obstrução da uretra, o que inviabiliza a utilização do cateter.

1.3. Cateterismo vesical: no sistema de drenagem fechado, inicialmente o fluxo da urina deverá ser interrompido na altura do tubo de drenagem, durante alguns minutos. A coleta de urina será então realizada com auxílio de seringa e agulha perfurando-se o cateter, após assepsia, na proximidade da junção com o tubo de drenagem, obtendo-se um volume

(5-10 ml) suficiente para o exame. A parte distal do cateter urinário não é adequada para cultura e deve ser recusada, a urina proveniente da bolsa coletora também não é apropriado para exame.

OBS: No caso de crianças de baixa faixa etária utiliza-se coletores plásticos esterilizados, que são fixados à pele após uma rigorosa higienização da genitália externa e áreas adjacentes. É notório o grande número de casos de resultados falsos positivos devido a contaminação pela microbiota perineal, deste modo, é necessário a substituição dos coletores a intervalos de no máximo uma hora, caso seja obtida a micção.



Fig. 04: Coleta de urina do jato médio em mulheres

Fonte: <http://unifag.com.br/voluntario/orientacao-coleta-exames.vm>

A NÃO REALIZAÇÃO DA HIGIENE PODE CAUSAR INTERFERÊNCIA NO RESULTADO DE SEU EXAME

MÉTODO DE COLETA - HOMENS



Lave as mãos



Exponha a glândula (cabeça) e mantenha o prepúcio (pele) retraído



Lave com água e sabão. Enxágue com água em abundância



Enxugue com papel toalha



Comece a urinar no vaso sanitário



Sem interromper a micção, coloque o copo descartável na frente do jato urinário e colete aproximadamente 2 dedos de urina

*** Tampe o frasco com cuidado para evitar contaminação.**

Fig. 05: Coleta de urina do jato médio em homens

Fonte: <http://unifag.com.br/voluntario/orientacao-coleta-exames.vm>

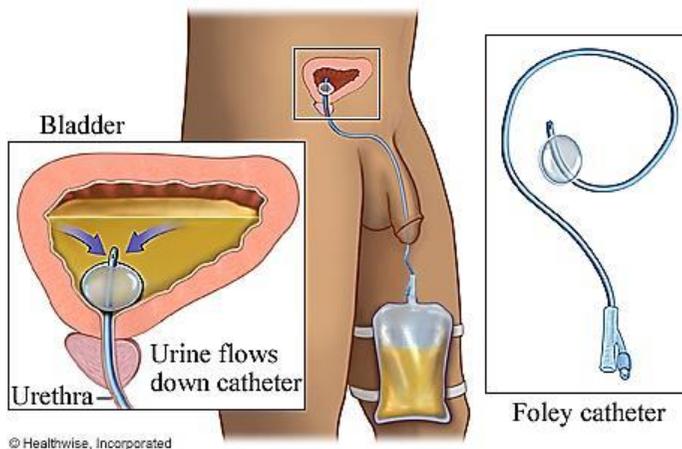


Fig. 06: Cateter vesical

Fonte:

<http://ocuidaremenfemagem.blogspot.com.br/2012/11/sondas-cou-cateteres.html>



Fig. 07: Coleta de urina de cateter

Fonte:

www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=0ahUKEwilj5aZ5MnRAhXjiZAKHeF8BqYQjRwIBw&url=https%3A%2F%2Fwww.youtube.com%2Fwatch%3Fv%3D5NcA3eusPPg&bv=bv.144224172,d.Y2I&psig=AFQjCNH4rO3o542nawOt9PSLxdgGIr3Gmw&ust=1484763217103736

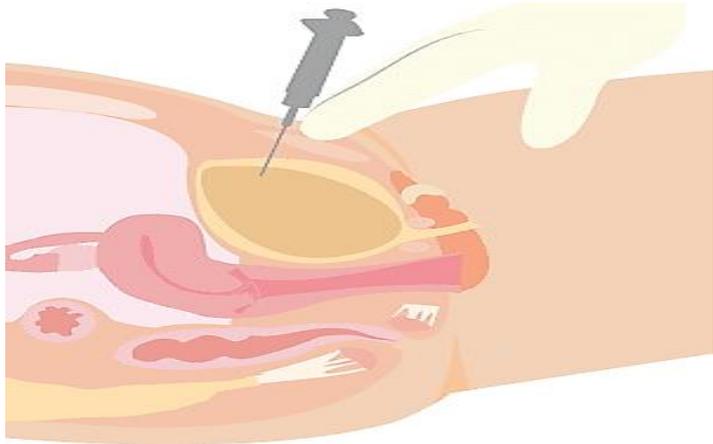


Fig. 08: Coleta de urina por punção suprapúbica

Fonte:

http://repecursos.unasus.ufma.br/nefro_autoinstrucional/curso3/und3/15.html

2. Secreção uretral

- Exame: Cultura ou bacterioscopia de secreção uretral;
- Objetivo: Diagnóstico das uretrites masculinas, geralmente decorrentes de IST's.

A coleta de secreção no homem é relativamente simples quando o corrimento é abundante, mas deve ser bem executada. O material deve ser colhido pela manhã, antes do paciente ter urinado e sem tomar qualquer medicação. É possível a coleta em qualquer hora, desde que o corrimento seja abundante e o paciente não esteja em tratamento.

Instruímos o paciente para que retraia o prepúcio e limpamos o meato com gaze montada em pinça Kelly

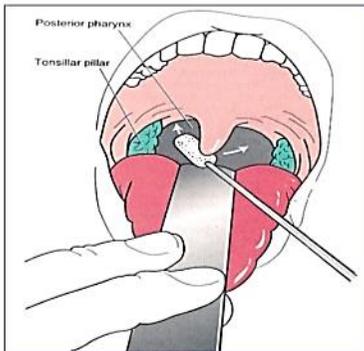
umedecida com solução fisiológica estéril. Em seguida fazemos o paciente espremer o pênis da base para o meato, aos poucos coletamos o material à medida que este for sendo expelido pelo meato com o auxílio de um swab estéril. Preparar dois esfregaços em lâminas previamente limpas e identificadas. Caso o exame a ser realizado seja a cultura, coletar o primeiro swab e acondicionar em tubo de ensaio estéril e enviar imediatamente para realização do exame.

3. Secreção da orofaringe

- Exame: Cultura de secreção da orofaringe

-Objetivo: Diagnóstico de faringites e faringoamigdalites.

Coletar o material diretamente da região da orofaringe com auxílio de swab estéril com cuidado para não tocar na língua ou dentes.



Coleta
Secreção de orofaringe

Fig. 09: Coleta de secreção da orofaringe

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/9629138/>

4. Sangue

-Exame: Hemocultura

- Objetivo: Diagnóstico de bacteremia e septicemia

A presença de bactérias no sangue (bacteremia) é frequentemente contínua, em casos de infecções intravasculares como nas endocardites, na fase aguda das infecções não tratadas e nas septicemias. Nesses casos, a possibilidade de encontro do agente causador da infecção no sangue é grande, durante as 24 horas do dia.

Outras vezes, a bacteremia é intermitente e pode vir depois de uma hora do aparecimento de calafrios. Nesses casos, a coleta deve coincidir com os primeiros sinais de febre.

Em pacientes submetidos à terapêutica antimicrobiana poderão ser necessárias várias amostras, sendo algumas delas quando o nível do antimicrobiano ou quimioterápico estiver em seu nível mais baixo.

A hemocultura é o exame que mais necessita de uma assepsia do paciente, pois o isolamento de um micro-organismo é, em geral, significativo. Sendo feito preferencialmente antes da aplicação de medicação bacteriana.

A pele humana altamente contaminada, determina as principais causas de contaminações de hemocultura: a primeira causa é a preparação inadequada da pele do paciente, a segunda causa é a palpação da pele desinfetada, com os dedos (não protegidos por luva estéril) de quem está coletando sangue.

Etapas:

- Selecionar o melhor local para coleta de sangue, aplicando o garrote e apalpando livremente as veias do paciente, escolhendo a veia mais calibrosa e menos móvel;

- Com gaze montada em pinça Kelly, lavar a pele com sabão líquido a 5%. A gaze é passada em movimento centrífugo, em espiral, iniciando no ponto que vai ser perfurado pela agulha, progredindo num sentido único e não voltando ao ponto inicial. Desprezar a gaze;

- Com outra gaze montada, remover o sabão com álcool a 70 % também em movimentos centrífugos e despreza a gaze;

- Com gaze ou algodão, aplicar centrifugamente álcool iodado a 1% esperar 1 minuto;

- Remover o álcool iodado com álcool a 70%, usando movimentos centrífugos e descartando as gazes;

- Deixar o álcool evaporar e, sem tocar na área, puncionar a veia.

- Antes de introduzir a agulha no paciente, preparar o frasco de cultura com rolha perfurável e, sem abrí-lo, colocar um algodão com iodo a 1% em cima da rolha e limpar em seguida, com álcool a 70%, cobrir a rolha com gaze estéril.

- Retirar 5 a 10 ml de sangue de adultos e 1 a 2 ml de crianças;

- Afrouxar o garrote, retirar a seringa e fazer hemostasia;

- Retirar a gaze estéril que estava cobrindo a rolha do frasco;

- Perfurar a rolha com a agulha da seringa contendo o sangue colhido e injetar imediatamente o sangue no frasco, nas quantidades apropriadas.

5. Secreção Vaginal/ cervical

- Exame: Bacterioscopia e/ ou cultura de secreção vaginal/cervical

- Objetivo: Diagnóstico das vaginites e cervicites

A coleta do material deve ser feita de preferência pela manhã, sem que a paciente tenha feito a higiene íntima. A paciente não deve estar usando medicamentos locais há pelo menos 48 horas, nem estar tomando, por esse período de tempo, quimioterápicos ou antimicrobianos. Outras recomendações são que a paciente não tenha tido relações sexuais há pelo menos 48 horas, não tenha urinado há pelo menos duas horas e não esteja em período menstrual.

Caso a paciente apresente corrimento evidente, ela deverá ser colocada em posição ginecológica e o corrimento é colhido externamente com auxílio de swab estéril e identificado com letras EXT, para indicar que se trata de material externo, esse material serve para a pesquisa de fungos e *Trichomonas*.

Após a coleta do material externo e, com o consentimento da paciente, introduzimos o espécúlo vaginal, sem lubrificante. O espécúlo é introduzido fechado, com valvas em posição vertical. Quando já introduzido, o especulo é rodado de modo que suas valvas fiquem em posição horizontal. Em seguida, abrimos as valvas e acertamos sua posição para expor o fundo de saco vaginal e o colo uterino. Com boa iluminação, colhemos a secreção acumulada no fundo de saco vaginal com swab identificando como FSV, que significa material de fundo de saco vaginal.

Após a coleta do material do fundo de saco vaginal, se houver pedido de cultura de secreção cervical, procedemos à

limpeza do fundo de saco vaginal e do colo do útero, com a troca de duas ou três gazes montadas em pinça Kelly, umedecidas em solução salina estéril. Após a coleta retiramos o espéculo e limpamos a genitália externa, com duas ou três gazes montadas em pinça Kelly, umedecidas em solução salina estéril.

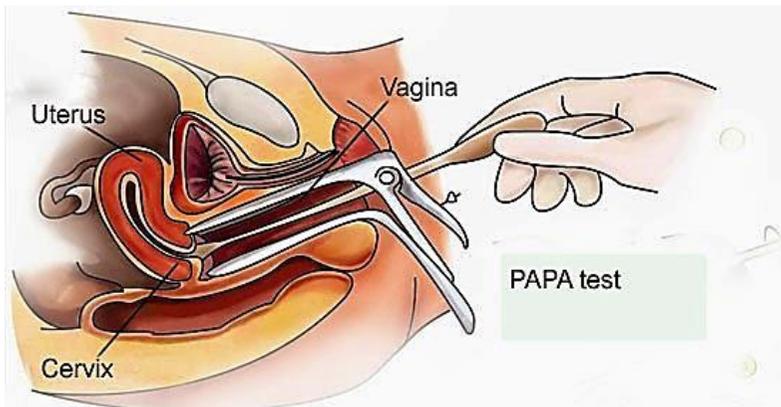


Fig. 10: Coleta de secreção vaginal e cervical

Fonte: <http://www.papanicolau.net/>

6. Secreção Ocular

- Exame: Cultura de secreção ocular
- Objetivo: Diagnóstico de conjuntivites bacterianas

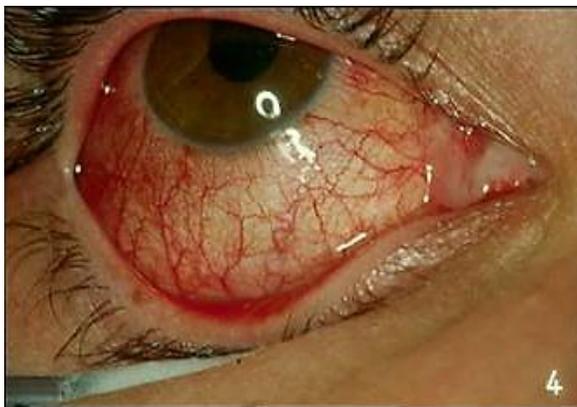


Fig. 11: Secreção ocular

Fonte: www.iobh.com.br/conjuntivites-bacteriana

7. Secreções de Lesões

- Exame: Bacterioscopia e/ou cultura
- Objetivo: Diagnóstico de infecções superficiais causadas por bactérias

Proceder coleta da lesão com swab estéril, após a limpeza do local da lesão com solução salina.



Fig. 12: Lesões

Fonte: <http://www.slideshare.net/tsalles/coleta-de-amostras-brasil>

8. LCR (Líquido Céfalo Raquidiano)

- Exame: Bacterioscopia e/ou cultura
- Objetivo: Diagnóstico da meningites bacterianas

A coleta do material é feita por punção lombar, em condições rigorosamente assépticas, devendo-se remeter o material imediatamente ao laboratório.

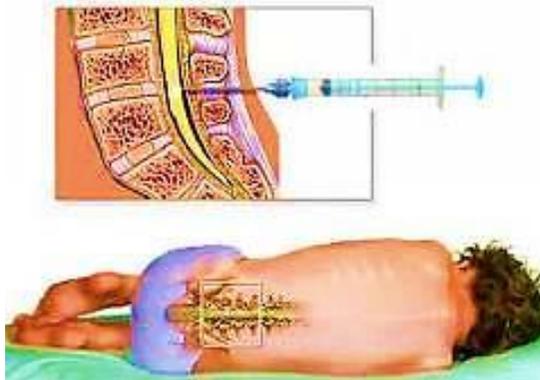


Fig. 13: Coleta de LCR

Fonte: infectologista.net

3. Cateter Venoso

- Exame: Cultura de cateter
- Objetivo: Avaliar a contaminação de cateteres venosos de longa permanência.

A pele em volta do cateter deve ser cuidadosamente desinfetada com solução de iodo ou PVPI, e o excesso removido com álcool a 70 %. Um segmento de aproximadamente 5 cm do cateter é assepticamente cortado, com auxílio de tesoura, e remetido, em prazo mínimo, ao laboratório, em tubo de ensaio sem líquido.

10. Raspado intradérmico

- Exame: Pesquisa de BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes)

- Objetivo: Diagnóstico de Hanseníase

Fazer assepsia do local com álcool-iodado, fazer ligeira incisão com bisturi e colher o raspado intradérmico de 4 sítios de coleta, colocando-a diretamente em lâmina de microscopia para a confecção de esfregaço. Recomenda-se os seguintes sítios: lesão ativa ou dormentes, nódulo, lóbulo da orelha direita e esquerda, caso não haja lesão ou nódulo colher dos cotovelos direito e/ou esquerdo.



Fig. 14: Coleta do raspado intradérmico

Fonte: Ebah.com.br

11. Escarro

- Exame: Pesquisa de BAAR
- Objetivo: Diagnóstico da tuberculose pulmonar

O Ministério da saúde recomenda a coleta de duas amostras em dois dias consecutivos. A coleta deverá ser feita pela manhã em jejum após higiene bucal. O paciente deverá ser instruído para respirar profundamente e tossir forte não mais que 3 vezes e escarrar diretamente em recipiente de boca larga.



Fig. 15: Coleta de escarro

Fonte: <http://conhecendoatuberculose.blogspot.com.br/>

ANTIBIOGRAMA

1. Introdução

Denomina-se antibiograma à técnica que estabelece “*in vitro*” a sensibilidade ou a resistência dos micro-organismos aos diferentes antimicrobianos e quimioterápicos, cujos resultados são aplicados “*in vivo*”. O resultado expressa uma indicação para se conseguir a terapêutica racional em diferentes processos patológicos causados por micro-organismos.

2. Prova de sensibilidade por difusão em meio sólido ou método de Kirby- Bauer (Modificado pelo FDA)

Nos testes pelo método da difusão, os discos de papel impregnados com o antimicrobiano são colocados na superfície do meio de cultura uniformemente semeado com o micro-organismo. Forma-se, então, um gradiente de concentração pela difusão do antimicrobiano a partir do disco pelo ágar, com conseqüente inibição do crescimento de um micro-organismo sensível. A base para o julgamento de sensibilidade é o diâmetro real do halo de inibição (zona sem crescimento em volta do antimicrobiano). Este método informa se um micro-organismo é sensível ou resistente a um determinado antimicrobiano ou quimioterápico.

3. Critérios para obtenção de resultados exatos e reprodutíveis

3.1. Meio de cultura: o meio de cultura ideal é o ágar Mueller-Hinton, pH 7,2- 7,4, espessura do meio na placa 4-6 mm, que corresponde a 20-25 ml de meio para uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro.

3.2. Preparo de inóculo: a turbidez da suspensão bacteriana deve ser ajustada a 10^8 bactérias/ml que corresponde ao tubo 1 da escala de Mac Farland (0,5 ml de cloreto de bário a 1% + 99,5 ml de solução de ácido sulfúrico a 1% ou 0,36 N).

Obs: A suspensão não deve ser muito concentrada ou muito diluída, pois pode levar a falsos resultados. Se for muito concentrada pode apresentar uma falsa resistência e muito diluída uma falsa sensibilidade.

3.3. Escolha dos discos: os discos devem ser de material que permita uma difusão homogênea para o meio e não interfira na atividade do antimicrobiano. Devem ser conservados a 4°C.

3.4. Condições de incubação: atmosfera de aerobiose, anaerobiose ou microaerofilia, temperatura de 35-37 °C, período de 18-24 horas.

4. Técnica

4.1 Fazer uma suspensão homogênea em caldo Mueller-Hinton ou solução salina de colônias de cultivo puro;

4.2 Acertar a turbidez da suspensão comparando-a à turbidez do tubo 1 da escala de Mac Farland;

- 4.3 Homogeneizar a suspensão e umedecer um swab estéril na mesma. Pressionar o swab contra a parede do tubo para remover o excesso e semear em toda a superfície da placa. Deixar secar a temperatura ambiente;
- 4.4 Com uma pinça estéril adicionar os discos na superfície do meio, fazendo uma leve pressão para aderir bem, deixando uma distância de um disco para outro e dos discos para as bordas da placa de aproximadamente 2 cm;
- 4.5 Incubar a placa em posição invertida.

5. Leitura e interpretação

Medir o diâmetro do halo de inibição formado ao redor do disco, com uma régua em mm. Interpretar o resultado de acordo com a tabela de padrões interpretativos de sensibilidade ou resistência para cada antimicrobiano.

R (Resistente): não apresenta halo de inibição ao redor do disco ou apresenta o halo de inibição menor que o padrão de sensibilidade.

S (Sensível): apresenta o halo de inibição ao redor do disco igual ou superior que o padrão de sensibilidade.

Obs: a presença de colônias isoladas no halo de inibição, indica a ocorrência de mutantes resistentes ao antimicrobiano. O aparecimento desses mutantes na população bacteriana ocorre devido aos fenômenos de mutação espontânea, mecanismos de recombinação ou transposição.

6. Indicação do Antibiograma

6.1. Condições em que o antibiograma é dispensável.

- Quando se conhece o comportamento de determinadas bactérias frente aos antimicrobianos, sendo excepcional o aparecimento de cepas resistentes. Ex: penicilina para *S. pyogenes*;

- Doenças que já têm uma linha de tratamento instituída e comprovadamente eficaz. Ex: Clorafenicol e sulfas para salmoneloses;

- Doenças de curso rápido, fatais se não tratadas de imediato. Ex: meningite e septicemia;

- Tratamento local de infecções da pele, olhos e ouvidos, nestas condições é muito comum, pelo menos no início, não ser feito o antibiograma.

6.2. Condições em que o antibiograma é indispensável.

- Infecções estafilocócicas graves ou moderadas, com microrganismo produtor ou não de penicilinas, visto que muitas cepas destas bactérias apresentam resistência a um ou vários antimicrobianos;

- Infecções por enterobactérias, muitas cepas apresentam resistência a uma ou a vários antimicrobianos;

- Infecções urinárias;

- Infecções hospitalares.

6.3. Divergências com a resposta terapêutica (antibiograma sensível e paciente não responde ao tratamento)

- Mais de um micro-organismo patogênico e foi administrado o antibiótico apenas um;

- Isolamento e teste do germe errado (não patogênico ou secundário);

- Aparecimento de um mutante resistente ausente no isolamento primário ou despercebido no repique das colônias;
- A resposta é correta, o germe no entanto foi protegido da droga pela ação de um germe secundário que é neutralizado por um produto metabólico (ex: penicilinase);
- Fatores que não são de responsabilidade do laboratório, como: dosagem incorreta e má administração da droga e características do paciente ou de sua doença;
- O comportamento “*in vitro*” da bactérias é diferente de “*in vivo*”.

7. Critérios para a escolha do antimicrobiano

- O mais eficaz, contra a bactéria isolada na cultura;
- O menos tóxico ao paciente. Ex: se a bactéria é sensível ao cotrimoxazol, cefalexina, gentamicina e amicacina, é preferível usar o cotrimoxazol e cefalexina, que não têm o risco de toxicidade renal existente com uso de aminoglicodídeos (gentamicina e amicacina);
- Se o paciente é ambulatorial deve dar preferência aos antimicrobianos que têm apresentação para uso oral;
- Localização da infecção, um determinado antimicrobiano pode penetrar e atingir maiores concentrações que outros na bile, urina ou líquido. O norfloxacin, uma quinolona, atinge boa concentração apenas na urina e não em outros fluídos ou tecidos orgânicos;
- O estado clínico do paciente, deve ser avaliado nas seguintes situações, por exemplo, quando o paciente é nefropata, hepatopata, alérgico a penicilina ou encontra-se grávida;

- O custo é relativo do tratamento deve ser pesado, tendo em vista as condições econômicas precárias da maior parte da população.

PADRÃO PARA INTERPRETAÇÃO DOS HALOS DE INIBIÇÃO					
Antimicrobianos		Zonas de inibição em mm.			
	Sigla	Conc.	Resist.	Intermed.	Sensível
Ac. Nalidixico	NAL	30µg	<13	14-18	>19
Ac. Pipemidico	PIP	20µg	<13	14-18	>19
Amicacina	AMI	30µg	<14	15-16	>17
Ampicilina	AMP	10µg	<13	14-16	>17
p/Gram negativos entéricos			<13	14-16	>17
p/estafilococos			<28	-	>29
p/Enterococos			<16	-	>17
p/Estreptococos não enterococos			<21	22-29	>30
Amoxicilina/Ac. Clavulânico	AMC	10/10 µg	<13	14-17	>18
Ampicilina/Sulbactan	MAS	10/10 µg	<11	12-14	>15
Azitromicina	AZT	15 µg	<13	14-17	>18
Aztreonam	ATM	30µg	<15	16-21	>22
Carbenicilina	CAR	100µg	-	-	-
p/pseudomonas			<13	14-16	>17
p/outros organismos			<19	21-22	>23
Cefaclor	CFC	30µg	<14	15-17	>18
Cefalotina	CFL	30µg	<14	15-17	>18
Cefepima	CFP	30µg	<14	15-17	>18
Cefeperazona	CPZ	30µg	<15	16-20	>21
Cefotaxima	CTX	30µg	<14	15-22	>23
Cefoxitina	CFO	30µg	<14	15-17	>18
Ceftazidime	CAZ	30µg	<14	15-17	>18
Ceftriaxona	CRO	30µg	<13	14-20	>21
Cefuroxima	CRX	30µg	<14	15-17	>18
Ciprofloxacina	CIP	5µg	<15	16-20	>21
Clindamicina	CLI	2µg	<14	15-20	>21
Cloranfenicol	CLO	30µg	<12	13-17	>18
Eritromicina	ERI	15µg	<13	14-22	>23
Gentamicina	GEN	10µg	<12	13-14	>15

Imepenem	IPM	10µg	<13	14-15	>16
Lomefloxacin	LMX	10µg	<15	16-18	>19
Meropenem	MEM	10µg	<13	14-15	>16
Minociclina	MIN	30µg	<14	15-18	>19
Moxalactam	MOX	30µg	<14	15-22	>23
Mupirocina	MUP	5µg	<17	-	>18
Netilmicina	NET	30µg	<12	13-14	>15
Nitrofurantoina	NIT	300µg	<14	15-16	>17
Norfloxacin	NOR	10µg	<12	13-16	>17
Orfloxacin	OFX	5µg	<12	13-15	>16
Oxacilina	OXA	1µg	-	-	-
p/Estafilococos			<10	11-12	>14
p/ Pneumococos			<19	-	>20
Penicilina	PEN	10UI	-	-	-
p/Estafilococos			<28	-	>29
p/Enterococos			<14	-	>15
p/ Estreptococos não enterococos			<19	20-27	>28
p/ Gonococo			<26	27-46	>47
Rifampicina	RIF	5µg	<16	17-19	>20
Sulfonamidas	SUL	300µg	<12	13-16	>17
Sulfazotrim	SUT	23,75 µg	<10	11-15	>16
Teicoplanina	TEC	30µg	<10	11-13	>14
Tetraciclina	TET	30µg	<14	15-18	>19
Ticarclina/ Ac.Clavulânico	TIM	75/10 µg	<14	-	>15
Trobramicina	TOB	30µg	<12	13-14	>15
Vancomicina	VAN	30µg	<9	10-11	>12



Fig. 16: Antibiograma

Fonte: sbmicrobiologia.org.br

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS*

1. Introdução

A identificação de cocos Gram positivos é uma parte importante do trabalho na Microbiologia clínica, e as infecções mais comuns são causadas pelos *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que pertencem ao grupo dos cocos piogênicos que se caracterizam pela formação de pus.

O gênero *Staphylococcus* compreende várias espécies das quais quatro são patógenos importantes para os seres humanos, dessas quatro, três estão bem caracterizadas, são elas: *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*.

2. Material biológico

Pús ou exsudato de lesões, sangue, urina, expectorações, secreções uretrais, oculares e de ouvido, do orofaringe, conteúdo vaginal e LCR.

Em portadores suspeitos: exsudato e secreção do orofaringe e nasal.

As amostras clínicas devem se coletadas do local exato da infecção e, com instrumentos estéreis (swabs, seringas, etc.), evitando-se ao máximo a contaminação. Esta amostra deve ser mantida adequadamente afim de permitir a recuperação da bactéria.

3. Exames

3.1. Bacterioscopia

3.2. Cultura

3.2.1. Isolamento

Os meios de cultura utilizados no isolamento são ágar Sangue e o ágar Chapman (Manitol).

O material suspeito é semeado na superfície do meio de cultura, por estrias na superfície, e incubado a 35-37°C/18-24 horas.

Após a incubação as colônias suspeitas em ágar sangue apresentam-se brancas ou amarelas com ou sem hemólise, pequenas de contorno regular.

3.2.2. Identificação

a) Prova da catalase (identificação do gênero)

1. Fundamento: verificar a presença da enzima catalase, que é uma enzima do sistema respiratório da bactéria que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

2. Técnica

- Adicionar 2 gotas de água oxigenada a 30% em um tubo ou 1 gota em lâmina;

- Acrescentar 1 alçada de colônia, emulsionar.

3. Leitura e Interpretação

- Prova Positiva: formação de bolhas;

- Prova negativa: ausência de bolhas.

b) Prova de coagulase

1. Fundamento: verificar a capacidade da bactéria em coagular o plasma, devido a presença da enzima coagulase, que é uma proteína termoestável, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, provocando a formação do coágulo.

2. Técnica

- Adicionar 0.5 ml de plasma em tubo de ensaio;
- Acrescentar 1 alçada da colônia e incubar a 35-37°C/2-24 horas.

3. Leitura e interpretação

- Prova positiva: formação de coágulo;
- Prova negativa: ausência de coágulo.

c) Fermentação do Manitol

1. Fundamento: fermentação do manitol com produção de ácido, ocorrendo a viragem do indicador de pH (vermelho fenol) do vermelho para o amarelo.

2. Técnica: semear o material biológico no ágar manitol e observar a coloração do meio após o período de incubação.

3. Leitura e interpretação

- Prova positiva: o meio fica amarelo;
- Prova negativa: o meio fica com a cor inalterada.

d) Prova de sensibilidade à Novobiocina

1. Fundamento: verificar se a bactéria é sensível ao antimicrobiano novobiocina.

2. Técnica

- Semear em ágar Mueller-Hinton, com auxílio de um swab, uma suspensão de *Staphylococcus* em estudo;
- Acrescentar um disco de novobiocina e incubar a 35-37°C/18-24 horas.

3. Leitura e interpretação

- Sensibilidade (S): inibição do crescimento ao redor do disco com aproximadamente 20 mm de diâmetro.

- Resistência (R): crescimento na área adjacente ao disco.

**TABELA DE IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS
ESPÉCIES DE *Staphylococcus***

ESPÉCIES	PROVAS			
	CATALASE	COAGULASE	MANITOL	SENS. A NOVOBICIONA
<i>S. aureus</i>	+	+	+	<i>Sensível</i>
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	<i>Resistente</i>
<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	<i>Sensível</i>

COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E HANSENIASE

Método de Ziehl-Neelsen

1. Técnica

- Cobrir o esfregaço com fucsina de Ziehl, marcar 5 minutos;
- Durante os 5 minutos aquecer a lâmina até a emissão de vapores esbranquiçados, pelo menos 3 vezes;
- Desprezar o excesso do corante e descorar com álcool-ácido 3% mantendo a lâmina inclinada até não mais desprender corante (máximo 2 minutos);
- Lavar com água corrente;
- Cobrir o esfregaço com azul de metileno durante 30 segundos;
- Lavar com água corrente;
- Secar e observar ao microscópio com objetiva de 100x.

OBS: Para coloração de raspado intradérmico para diagnóstico da hanseníase, recomenda-se a utilização da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, na qual a fucsina permanece no esfregaço durante 30 minutos, não sendo necessário o aquecimento, para descorar utiliza-se o álcool-ácido a 1%.

2. Fundamento

Baseia-se no fato de que certas bactérias (BAAR-bacilos ácido resistentes) quando tratadas com fucsina fenicada a quente (carbofucsina) resistem ao descolorimento por uma solução álcool-ácido. A álcool-ácido resistência é devido à alta hidrofobicidade da parede celular que possui alto teor de lipídeos complexos (60% de seu peso seco) fortemente ligados na sua parede celular que fixam a fucsina retida no interior da célula, permanecendo coradas em vermelho, não tomando portanto o corante de fundo (azul de metileno) e as outras não resistem ao descolorimento e tomam a coloração de fundo (azul).

Diagnóstico da Tuberculose e Hanseníase através da coloração de Ziehl- Neelsen (baciloscopia)

1. Introdução

O *M. tuberculosis* é o principal causador da tuberculose humana. A forma pulmonar é mais comum, podendo o bacilo também acometer outros órgãos causando a tuberculose renal, óssea, intestinal, cutânea e meningite.

O *M. leprae* causa a hanseníase em humanos, doença infecto- contagiosa crônica de longa duração.

2. Tuberculose

2.1. Coleta do material

Como a principal forma clínica é a pulmonar, colhe-se o escarro, o M.S. recomenda duas amostras (dois dias consecutivos). Amostra de 24 horas não é aconselhável devido

grande número de contaminantes. As amostras podem ser guardadas em geladeira até uma semana conservando sua positividade. A melhor coleta é pela manhã, após higiene bucal (tossir forte não mais que 3 vezes). No exame deve-se dar preferência às partes purulentas.

2.2. Realização do esfregaço e posterior coloração

2.3. Leitura e Interpretação

(-): ausência de BAAR em 100 campos examinados;

(1+): menos de 1BAAR por campo examinado;

(2+): de 1 a 10 BAAR por campo examinado;

(3+): mais de 10 BAAR por campo examinado.

3. Hanseníase

3.1. Coleta do material

Fazer assepsia do local com álcool-iodado, fazer ligeira incisão com bisturi e colher a linfa (não o sangue) de 4 sítios de coleta para cada esfregaço. Recomenda-se os seguintes sítios: lesão ativa ou dormente, nódulo, lóbulo da orelha direita e esquerda (no caso de não haver lesão ou nódulo coletar linfa dos cotovelos direito e/ou esquerdo).

3.2. Realizar a coloração

3.3. Leitura e interpretação (Escala de Ridley)

(-): ausência de BAAR em 100 campos examinados;

(1+): 1 a 0 BAAR em 100 campos examinados;

(2+): 11 a 99 BAAR em 100 campos examinados;

(3+): 1 a 100 BAAR por campo examinado;

(4+): 10 a 100 BAAR por campo examinado;

(5+): 100 a 1000 BAAR por campo examinado;

(6+): mais de 1000 BAAR por campo examinado.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

1. Introdução

As enterobactérias são bactérias que compõem a microbiota intestinal humana e desempenham importante papel etiológico em infecções intestinais, infecções relacionadas com procedimentos cirúrgicos em cavidade abdominal, infecções urinárias, infecções do trato respiratório, etc. Na família *Enterobacteriaceae* são conhecidos mais de 20 gêneros e mais de 100 espécies. Entretanto para fins práticos, convém investigar apenas as espécies de maior importância clínica.

A identificação das Enterobactérias, na grande maioria dos laboratórios de Microbiologia, ainda se baseia em provas bioquímicas clássicas que, embora demoradas, são as mais disponíveis e de boa qualidade. Comercialmente existem “Kits”, que, empregando métodos químicos e enzimáticos oferecem resultados em pouco tempo de incubação. Nem sempre porém, esses “Kits” se encontram no mercado e são economicamente viáveis.

2. Material biológico

3. Cultura

O material deve ser em meio de enriquecimento e meio seletivo. No caso de fezes se forem sólidas ou pastosas devem ser diluídas em solução fisiológica estéril antes da semeadura

em placas, se forem diarreicas podem ser semeadas diretamente no meio.

3.1. Enriquecimento

No cultivo de enterobactérias os meios de enriquecimento são utilizados para facilitar o isolamento de *Salmonella* e eventualmente *Shigella*. Semear aproximadamente 1g de fezes em caldo tetracionato e em caldo seletivo cistina. Incubar a 35-37°C/18-24 horas.

3.2. Isolamento

Nos meios seletivos os fermentadores de lactose ou sacarose produzem colônias com a cor que toma o indicador de pH ácido e os não fermentadores apresentam colônias transparentes.

Semear as fezes ou o cultivo do caldo de enriquecimento, em estrias, na superfície de ágar Mac Conkey e ágar SS. Incubar a 35-37°C/18-24 horas.

3.3. Identificação (provas bioquímicas)

***TSI (Tríplice açúcar com ferro)**

a) semeio: semear na base por picada e no ápice por estrias. Incubar a 35-37°C/18-24 horas.

b) fundamento:

- Fermentação de açúcares (glicose, lactose e sacarose) com produção de ácidos provocando a viragem do indicador de pH (vermelho fenol).

- Produção de ácido sulfídrico, através da redução de tiosulfato de sódio. O ácido sulfídrico reage com o ferro formando sulfeto de ferro e enegrecendo o meio.

- Produção e gás: ocorre a partir da fermentação dos açúcares.

c) Leitura

- Fermentação da glicose: ácido na base (amarelo) e alcalino na superfície (vermelho).

- Fermentação da lactose e/ou sacarose: ácido na base e na superfície (meio todo amarelo).

- Produção de gás: formação de bolhas de ar ou rachaduras no meio.

- Produção de ácido sulfídrico: o meio fica enegrecido.

MILi (Motilidade, Indol e Lisina): semear por picada.

***Motilidade**

a) Fundamento: as bactérias móveis, quando semeadas em meio semi-sólido difundem-se no meio, turvando-o, as móveis crescem apenas no local da picada.

b) Leitura:

- Positiva: crescimento fora do ponto de picada (móveis);

- Negativa: crescimento restrito ao ponto da picada (imóveis).

*** Indol**

a) Fundamento: degradação do triptofano, pela enzima triptofanase, com produção de indol que reage com o p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Kovacs).

b) Leitura: adicionar 2 gotas do reativo de Kovacs.

- Positivo: aparecimento de cor vermelha

- Negativa: a cor permanece inalterada (amarela).

*** Lisina**

a) Fundamento: fermentação da glicose com produção de ácido, acidificando o meio, com viragem do indicador de pH (o meio muda do púrpura para amarelo). Se a bactéria contém a enzima descarboxilase, ocorre a descarboxilação da lisina com produção da amina cadaverina, que neutraliza os ácidos produzidos na fermentação da glicose, alcalinizando o meio e proporcionando a viragem do indicador de pH (o meio muda de amarelo para púrpura novamente).

b) Leitura

- Positiva: o meio fica púrpura;

- Negativa: o meio fica amarelo.

***EPM (Semear por picada em profundidade e estrias na superfície)**

- Sacarose: mudança de cor azul esverdeada para amarelo, devido a fermentação ácida produzida pela sacarose;
- Ureia: em caso de reação positiva (hidrólise da ureia com produção de amônia);
- Glicose: a fermentação a glicose se processa com a produção de ácidos e liberação de gases. Pela produção de ácido, com consequente diminuição do pH, o indicador de pH (azul de bromotímol) para azul.

b) Leitura

- Positivo: o meio torna-se azul.
- Negativo: o meio permanece inalterado (verde).

IDENTIFICAÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS

Bactéria	Indol	LITD	Sacarose	Glicose	Gás	Ureia	H ₂ S	Lisina	Motil.
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Shigella</i>	-/+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Proteus</i>	-/+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	-/+	-	V	+	+	-	+/-	-	+
<i>Klebsiella</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Serratia</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Providencia</i>	+	+	V	+	V	-	-	-	+

+: 90% das cepas são positivas; -: 90% das cepas são negativas; +/-: 11

a 89% das cepas são positivas; -/+ : 11 a 89% das cepas são negativas;

V: resultado variável

TABELA DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTÉRIAS

Bactéria	Gás	LAC	H ² S	URE	IND	MOB	ORN	LIS	CIT	FAL
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	+	+/-	+/-	+	-	-
<i>Shigella (a, b, c)</i>	-	-	-	-	-/+	-	-/+	-	-	-
<i>S. sonnei (d)</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>S. typhi</i>	-	-	+/-	-	-	+	-	+	-	-
<i>C. freundii</i>	+	-/+	+	+/-	-	+	-/+	-	+	-
<i>C. diversus</i>	+	-/+	-	+/-	+	+	+	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>K. oxytoca</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>E. aerogenes</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i>	+	+	-	+/-	-	+	+	-	+	-
<i>Serratia spp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+	-
<i>P. vulgaris</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-/+	+
<i>P. mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+/-	+
<i>P. penneri</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>P. rettgeri</i>	-/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-/+	+	+	-	-	+	+
<i>M. morgani</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AGENTE DE INFECÇÕES URINÁRIAS

1. Introdução

A urina é produzida pelos rins e transportada para a bexiga pelos ureteres. A urina da bexiga é estéril. Entretanto, a parte distal da uretra, contém uma microbiota normal, de modo que a urina normal eliminada pode se contaminar ao passar pela uretra e apresentar um número pequeno de bactérias. Os microrganismos contaminantes mais comumente encontrados na urina são: *S epidermidis*, bacilos difteróides, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus* e leveduras.

As infecções do trato urinário têm como denominador comum a invasão do sistema urinário, na grande maioria das vezes por bactérias. Pode ocorrer a nível da uretra, bexiga ou sistema pielocalicial, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar e apresenta alto grau de morbidade, afetando pessoas de todas as idades e de ambos os sexos, sendo mais frequentes em crianças, mulheres grávidas ou pacientes com lesões obstrutivas do trato urinário.

Estas infecções quase sempre são causadas por microrganismos da microbiota intestinal normal, sendo a *E. coli* a bactéria mais frequentemente isolada em cerca de 80% casos. Nos 20 % restantes de casos são encontrados outras bactérias como: *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosas*,

Enterobacter, *Serratia*, *Providencia*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus saprophyticus*, *M. tuberculosis*, etc.

As enterobactérias via de regra atingem o sistema urinário por via ascendente, isto é, a partir da região anal e perianal, colonizam o vestibulo vaginal e daí ascendem pela uretra. Isto explica a maior incidência de ITU (infecções do trato urinário) em mulheres.

A via hematogênica ou descendente está mais relacionada à infecções por *Staphylococcus*, causando pielonefrite.

Além da infecção sintomática pode-se observar a presença de quantidades consideráveis de bactérias na urina, sem sintomas, o que é denominado bacteriúria.

2. Diagnóstico laboratorial

2.1 Material: Urina

2.2. Coleta do material

Amostras

- Jato médio da urina
- Urina colhida por cateterismo vesical
- Urina colhida por punção supra- púbica

2.3 Urocultura quantitativa

a) Objetivo: visa quantificar as bactérias presentes na urina, sendo o resultado expresso em número de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de urina.

b) Método (alça calibrada- 0.001ml)

- Inocular nos meios ágar CLED e ágar Mac Conkey 0,001 ml de urina com alça calibrada, espalhar por estrias em toda a superfície do meio;

- Incubar

- Contar as colônias que se desenvolveram e dividir pelo volume utilizado da amostra, o resultado é expresso em UFC/ml.

c) Leitura e Interpretação

* Amostra de urina do jato médio

- Igual ou superior a 100.000 UFC/ml: infecção mesmo que não existam sintomas.

* Amostra de urina colhida por cateter

- Igual ou superior a 100 UFC/ ml: infecção

* Amostra de urina colhida por punção suprapúbica:

- Qualquer número de UFC/ ml: infecção

2.4. Urocultura Qualitativa

a) Objetivo: isolamento e identificação a partir de uma mistura de bactérias existentes na urina da bactéria causadora da infecção.

b) Método: das contagens com resultados significativos de infecção no exame quantitativo, proceder a identificação de acordo com as características das colônias isoladas.

* Cocos Gram Positivos: crescimento apenas no ágar CLED, proceder a identificação de *Streptococcus* ou *Staphylococcus*.

* Bacilos Gram Negativos: crescimento no ágar CLED e ágar Mac Conkey, proceder identificação para enterobactérias ou Bacilos Gram negativos não fermentadores (*Pseudomonas*).

* Bacilos Gram Positivos e leveduras: geralmente trata-se de contaminação.

REFERÊNCIAS

- BIER, Otto. *Microbiologia e Imunologia*. 29ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990.
- KONEMAN, Elmer W. et al. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e atlas colorido*. 3ed. São Paulo: Editora Médica Panamericana, 1997.
- LEÃO, Raimundo Nonato Queiroz (coord). *Doenças Infecciosas e Parasitárias: enfoque amazônico*. Belém: CEJUP/UEPA/IEC, 1997.
- MIMIS, C. A., PLAYFAIR, J. H. L., ROITT, I. M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R. *Microbiologia Médica*. São Paulo: Manole, 1989.
- PELCZAR JR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. Vol. I e II. 2ed. São Paulo: Makron Books, 1996.
- SILVA, Carlos Henrique Pessoa de Menezes. *Bacteriologia: um texto ilustrado*. Teresópolis, RJ: Eventos, 1999.
- TRABULSI, Luiz Rachid. *Microbiologia*. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, Berdell R. ; CASE, Christine, L. *Microbiologia* 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SOBRE AS AUTORAS

ADJANNY ESTELA SANTOS DE SOUZA

Farmacêutica-Bioquímica (UFPA), Especialista em Microbiologia (PUC-Minas), Mestre e Doutora em Genética e Biologia Molecular (UFPA), Docente da FIT-UNAMA e UEPA.

ALDINE CECÍLIA LIMA COELHO

Enfermeira (UEPA).

Os micro-organismos surgiram na terra há cerca de 4 bilhões de anos e são adaptados a diferentes ambientes, como solo, ar e água. Dentre os micro-organismos destacam-se as bactérias. Algumas são benéficas aos seres humanos, envolvidas em processos utilizados na produção de alimentos, bebidas, medicamentos, biorremediação, fertilização do solo... Algumas são patogênicas, causando diversas doenças que necessitam ser estudadas, prevenidas, diagnosticadas e tratadas corretamente.

Esta obra se destina ao uso como roteiro de aulas práticas de Microbiologia no ensino da graduação, tem como objetivo oportunizar ao aluno o conhecimento de métodos e técnicas utilizadas no cultivo e identificação de bactérias, permitindo o diagnóstico de infecções causadas por bactérias.

