Aulas Práticas de

Bacteriologia Humana

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA

IPTSP UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS • UFG

Reitoria

Edward Madureira Brasil

Vice-Reitoria

Sandramara Matias Chaves

Pro-Reitoria de Graduação

Jaqueline Araujo Civardi

Organização

Mônica Santiago Barbosa

Autores

Felipe Augusto de Sousa Moraes • IPTSP UFG

Giovana Alice Sampaio Soares • IPTSP UFG

Profª Drª Lilian Carla Carneiro • IPTSP UFG

Profª Drª Mônica Santiago Barbosa • IPTSP UFG

Profª M.a Silvana Barbosa Santiago • IFG

Revisão Linguística

Prof. Dr. Aroldo Vieira de Moraes Filho • Medicina UFG

Profª Drª Débora de Jesus Pires • UFG (Itumbiara)

Profª Drª Erika Izumi Universidade • Tecnológica Federal do Paraná (Santa Helena)

Profª Drª Lara Stefânia Netto de oliveira Leão • IPTSP UFG

Profª Drª Mônica de Oliveira Santos • Medicina UFG

Profª Drª Nathalia Almeida de Sousa Gândara • IPTSP UFG

Profª Drª Rita de Cássia Rampazzo • Instituto de Biologia Molecular do Paraná (Curitiba)

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos • UFG

Profª Drª Rosália Santos Amorim Jesuíno • ICB UFG

Técnicos s Colaboradores

Aline Cristine Magalhães Costa Messias • IPTSP UFG

Aristides José Barbosa • IPTSP UFG

Gráfica UFG

Goiânia, 2020.

CENTRO INTEGRADO DE APRENDIZAGEM EM REDE • CIAR

Direção

Marlília de Goyaz

Vice-Direção

Silva Figueiredo

Coordenação de Publicação

Ana Bandeira

Desenvolvimento do e-book

Leandro Abreu

Diagramação

Laryssa Tavares

Edição e criação de imagens

Giovana Alice Sampaio Soares

Suporte Técnico

Amilton Araújo

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
GPT/BC/UFG

A924 Aulas práticas de Bacteriologia Humana. [e-book] / organizadora, Mônica Santiago Barbosa. – Dados eletrônicos. - Goiânia : Gráfica UFG, 2020. 16 p. : il.

Inclui bibliografia.
ISBN: 978-85-495-0326-8

Modo de acesso: World Wide Web: < http://temporario.ciar.ufg.br/IPTSP/bacteriologia_humana/index.html.> 1. Biologia – Estudo e ensino. 2. Educação. 3. Ensino – Metodologia. I. Barbosa, Mônica Santiago. CDU: 57:378.147.091.33-027.22

Bibliotecária responsável: Adriana P. Aguiar / CRB1: 3172

Biossegurança no Laboratório de Microbiologia

Introdução

A biossegurança abrange um conjunto de medidas que visam prevenir, controlar, mitigar e eliminar riscos inerentes às atividades que possam interferir ou comprometer a qualidade de vida, a saúde humana e o meio ambiente. Desta forma, a implementação de práticas adequadas no laboratório é primordial para evitar acidentes e garantir a qualidade das atividades realizadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Boas Práticas Laboratoriais

- É indispensável o uso de avental no laboratório. O avental deve ser, de preferência, comprido, com mangas compridas e estar abotoado. Removê-lo antes de deixar o laboratório;
- Sempre usar luvas, enquanto manipular amostras. Removê-las e lavar as mãos, quando o procedimento estiver concluído;
- Vestuário: calças compridas e sapatos fechados (idealmente de material não poroso e resistente), para impedir lesões no caso de acidentes com materiais perfurocortantes, substâncias químicas e materiais biológicos;
- Cabelos compridos devem permanecer sempre presos ou com gorros para evitar contato com materiais biológicos ou químicos;
- Evitar usar lentes de contato nos olhos em ambiente laboratorial, pois podem manter agentes infecciosos na mucosa ocular;
- As unhas devem ser, de preferência, curtas (o ideal é que não ultrapassem as pontas dos dedos);
- Evitar o uso de adornos como relógios, joias ou bijuterias e piercings, pois podem servir como depósitos para agentes infecciosos ou químicos;
- É proibido ingerir alimentos, beber ou fumar no laboratório;
- Evitar levar as mãos à boca, nariz, olhos, rosto ou cabelo, no laboratório;
- Utilizar na bancada somente o material necessário ao trabalho prático, como: roteiro de aula, papel ou caderno para anotação e caneta. Material extra deixar nas prateleiras abaixo das bancadas;
- Prestar atenção às atividades dos colegas ao lado, para evitar que materiais incompatíveis sejam manipulados ao mesmo tempo (exemplo: álcool e fogo);
- Evitar brincadeiras, distrações e conversas paralelas durante os procedimentos, pois podem causar sérios acidentes;
- Em caso de qualquer acidente (derramamento de culturas, quebra de placas, ferimentos, respingo de cultura etc.) comunicar imediatamente o professor ou o pessoal técnico responsável pela aula prática;

- Não cheirar placas de cultura, a inalação de agentes microbianos pode resultar em infecções;
- Não cheirar, nem provar substância alguma; pois algumas substâncias quando inaladas ou engolidas podem provocar queimaduras ou lesões;
- Descarte do material: (1) materiais contaminados devem ser colocados nos recipientes próprios existentes nos laboratórios; (2) placas de Petri utilizadas deverão ser deixadas tampadas sobre a bancada; (3) lâminas fornecidas pelos professores para visualização deverão ser deixadas sobre a bancada e tubos com culturas deverão ser deixados nas estantes;
- Terminados os trabalhos práticos: (1) flambar alças e fios de platina; (2) verificar se as torneiras de água e gás estão fechadas; (3) desligar lâmpadas e microscópios; (4) limpar os microscópios e cobri-los com a capa; (5) tirar o avental e guardar; (5) lavar cuidadosamente as mãos;
- As superfícies de trabalho do laboratório devem ser descontaminadas ao final das atividades e no final do dia.

A lavagem frequente das mãos é uma atitude importante na prevenção de contaminações. Devem ser lavadas sempre, após o contato com amostras, após a conclusão das práticas, após a remoção das luvas, antes de deixar o laboratório e antes de manipular comida ou bebida. Ensaboar todos os dedos e entre eles, as costas das mãos e os punhos e procure não tocar na torneira depois de lavar as mãos, faça isso com um a tolha de papel.

Coloração de Gram

Introdução

Em 1884, Hans Cristian Joaquim Gram observou que ao tratar bactérias com diferentes corantes, elas adquiriam cores distintas. Isso permitiu classificá-las em dois grupos: as que se coravam de roxas, então denominadas de Gram-positivas, e as que se coravam de rosa ou vermelhas, chamadas de Gram-negativas. Essa classificação se refere às diferenças da composição da parede celular. As bactérias Gram-negativas possuem uma fina camada de peptideoglicano e uma membrana externa composta por bicamada lipídica, a qual se solubiliza na presença do álcool-acetona (agente diferenciador), perdendo a coloração do cristal violeta (corante primário), adquirindo a coloração rosa ou vermelho do corante secundário, safranina ou fucsina. Já as bactérias Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptideoglicano e grandes quantidades de ácido teicóico, adquirem a coloração violeta ou roxa pela capacidade em reter o corante primário na presença do agente diferenciador, conforme descrito na figura 1 (OPLUSTIL et al., 2004).

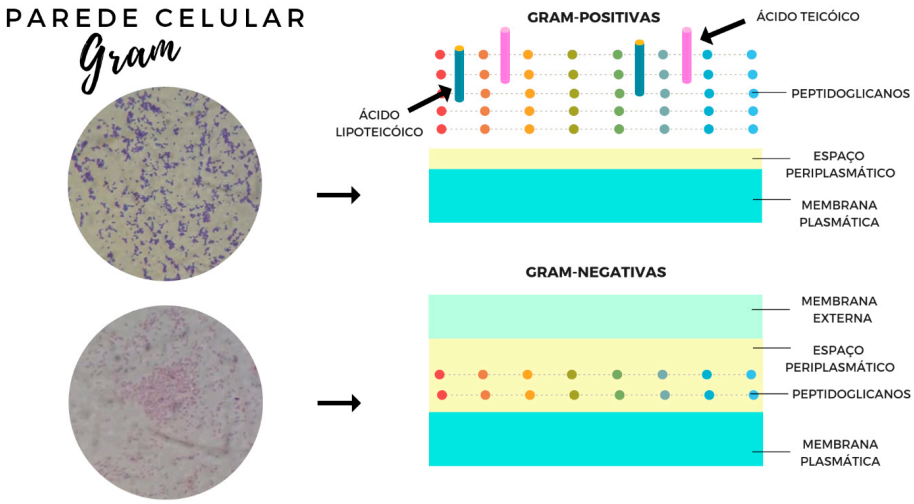

Figura 1. Esquema ilustrativo da estrutura da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas. **Fonte:** acervo próprio.

Na técnica de Gram, um esfregaço é fixado na lâmina pelo calor e coberto com um corante primário, geralmente o cristal violeta. Após um minuto, o esfregaço é lavado e em seguida cobre-se a lâmina com lugol, que age como mordente (fixador), fixando o cristal violeta. Nessa etapa tanto as bactérias Gram-negativas como as Gram-positivas permanecem com a coloração violeta. Em seguida, a lâmina é lavada com uma solução de álcool-acetona a 95%. Esta solução age como descolorante, retira o cristal violeta das bactérias Gram-negativas e deixando-as incolores. Após essa etapa o excesso do álcool é retirado e em seguida as bactérias são submetidas ao corante secundário, podendo ser a fucsina ou safranina a 0,1 a 0,2%. A lâmina é lavada, seca com papel-filtro e observada ao microscópio óptico, aplicar uma gota de óleo de imersão e observar na objetiva de imersão (100X) (Figura 2).

Objetivos

- Compreender e aprender sobre a técnica de Gram;
- Visualizar as diferentes morfologias entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Materiais

- Alça de platina (bacteriológica);
- Álcool-acetona (descorante);
- Bico de Bunsen;
- Cristal-violeta (corante);
- Cultura de bactérias Gram-positivas e/ou cultura de bactérias Gram-negativas;
- Fucsina ou Safranina (corante);
- Lâminas para microscopia;
- Lamínulas;
- Lugol a 1% (mordente);
- Microscópio óptico;
- Óleo de imersão;
- Papel absorvente.

Metodologia

- Confecção do esfregaço (colocar uma gota de salina sobre a lâmina, tocar com alça bacteriológica a colônia isolada e espalhar na salina com movimentos ovais. Fixar com calor, passando a lâmina sobre chama de bico de Bunsen de 2 a 3 vezes até completa secagem do esfregaço);
- Cobrir com cristal violeta por 1 minuto.
- Lavar com água corrente;
- Cobrir com Lugol 1% por 1 minuto;
- Lavar com água corrente;
- Aplicar o agente diferenciador álcool-acetona 95% por 10 a 20 segundos;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir com Fucsina ou Safranina (0,1 a 0,2%) por 30 segundos;
- Lavar com água corrente e secar com papel-filtro;
- Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100X).

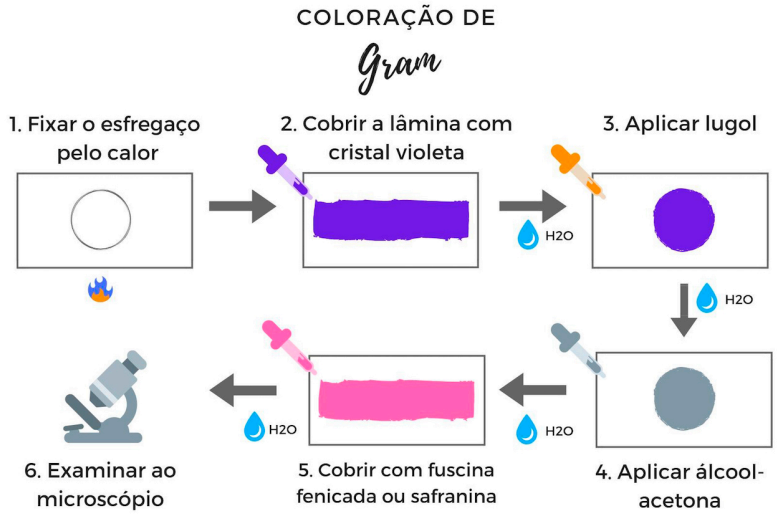

Figura 2. Etapas do procedimento da coloração de Gram. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Na técnica de Gram, qual solução é o agente diferenciador e qual é considerada mordente?
2. Explique por que as bactérias Gram-negativas apresentam coloração diferente das bactérias Gram-positivas.

Isolamento e Identificação de *Staphylococcus* spp.

Introdução

O gênero *Staphylococcus* possui esse nome por apresentar uma morfologia que se assemelha a cachos de uvas, embora possa apresentar outras formas, como células únicas, aos pares ou cadeias curtas. São cocos Gram-positivos, isolados aos pares, tétrades, cadeias curtas ou cachos irregulares. A maioria dos estafilococos são, imóveis, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em meios com altas concentrações de sal. São bactérias mesófilas (temperaturas entre 18 °C e 40 °C) e não esporuladas. Colonizam a pele e mucosas

de seres humanos e podem causar vários desfechos clínicos, como infecções de pele, ossos, tecidos moles, trato urinário e infecções oportunísticas. Todos os estafilococos são catalase positivo, entretanto, apenas o *Staphylococcus aureus* apresenta positividade para os testes de coagulase e DNAse (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Compreender os passos para o isolamento e a identificação dos Staphylococcus spp;
- Visualizar as possíveis formas apresentadas pelos estafilococos.

Materiais

- Ácido clorídrico a 37%;
- Ágar DNAse;
- Ágar manitol salgado (7,5% NaCl);
- Ágar Mueller Hinton com discos de novobiocina contendo 5 µg;
- Ágar nutriente;
- Alça bacteriológica;
- Amostra biológica (swab da nasofaringe);
- Lâminas e lamínulas;
- Peróxido de hidrogênio a 3% (10V);
- Plasma;
- Salina;
- Swab.

Metodologia

Para o isolamento de estafilococos semear a amostra biológica em ágar manitol salgado, que é um meio seletivo e diferencial. A seletividade do meio ocorre pela alta concentração de cloreto de sódio (NaCl 7,5%) e é diferencial pela mudança de coloração do meio de rosa para amarelo, que ocorre após a metabolização do manitol pela bactéria. A degradação do manitol resultará na produção de ácido que é detectada pelo indicador de ph (vermelho de fenol) presente no meio. *Staphylococcus sp* cresce na concentração de NaCl 7,5% e apenas o *Staphylococcus aureus* utiliza o manitol como fonte de energia. Outras espécies como *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* cresce no ágar manitol, mas o meio continuará com sua cor original (vermelho rosado) e as colônias brancas; já S. aureus, mudará de cor vermelho rosado para o amarelo e apresentará colônias amarelas (Figura 3). Para realização de provas adicionais para identificação de espécies de *Staphylococcus sp* é necessário transferir as colônias do ágar manitol salgado para o ágar nutriente, pois o excesso de sal pode interferir nos resultados.

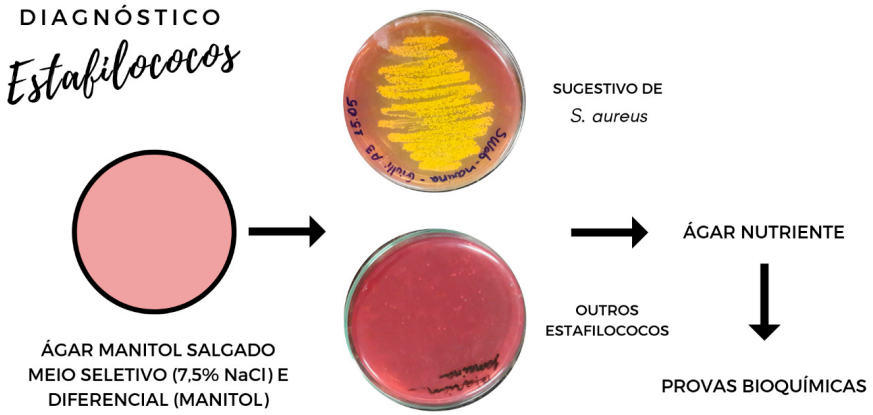

Figura 3. Etapas de identificação de ***Staphylococcus spp***. **Fonte:** acervo próprio.

As provas adicionais para identificação de espécies de *Staphylococcus sp* são:

Prova da catalase: se baseia na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, tendo então formação de gás (bolhas). Estafilococos são catalase positivo (Figura 4). É feito pingando uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina, e com uma alça bacteriológica retirar uma colônia do meio de cultura e encostar na lâmina com movimentos circulares, observando a formação ou não de gás (bolhas).

Prova da coagulase: esse teste verifica se o microrganismo expressa a enzima coagulase. Os microrganismos que possuem essa enzima são capazes de coagular o plasma, por apresentar uma atividade semelhante à da protrombina. A coagulase pode ser encontrada de duas formas, coagulase conjugada e coagulase livre. A **coagulase conjugada** (prova em lâmina) é encontrada na parede celular bacteriana e não em filtrados de cultivo. Quando as bactérias são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas, havendo a formação de grumos visíveis. É feito colocando uma gota de solução fisiológica estéril sobre uma lâmina, misturar a colônia suspeita na gota de solução fisiológica, coloca-se uma gota do plasma sobre a mistura de colônia com salina e homogeneizar, e por último observar a formação de grumos branco entre cinco a 20 segundos. A coagulase livre (prova em tubo) está presente em filtrados de cultivos. A enzima é secretada e reage com uma substância presente no plasma denominado de Fator de Coagulação de Plasma, agindo no fibrinogênio e formando fibrina (coágulos). Colocar 0,5 mL de plasma em tubo de vidro, com uma alça colocar a colônia no plasma dentro do tubo, homogeneizar com a própria alça (não pode agitar), após isso é preciso incubar em banho maria a 37 °C por quatro horas e inclinando suavemente o tubo avaliar a formação de coágulo. A coagulase é considerada um fator de virulência da bactéria, pois os coágulos formados "camuflam" o microrganismo do sistema imune do hospedeiro. O *S. aureus* é coagulase positivo (Figura 4).

Prova da DNAse: esse teste verifica se a bactéria tem a capacidade de degradar DNA. A colônia é semeada em ágar DNA e após o período de incubação, utiliza-se HCl a 37% para a revelar a presença ou não do halo. O *S. aureus* apresenta positividade para esse teste (Figura 4).

Teste de resistência à novobiocina: esse teste é realizado para diferenciar as espécies *S. epidermidis* e *S. saprophyticus.* A espécie *S. saprophyticus* é resistente a novobiocina, enquanto o *S. epidermidis* sensível (Figura 4).

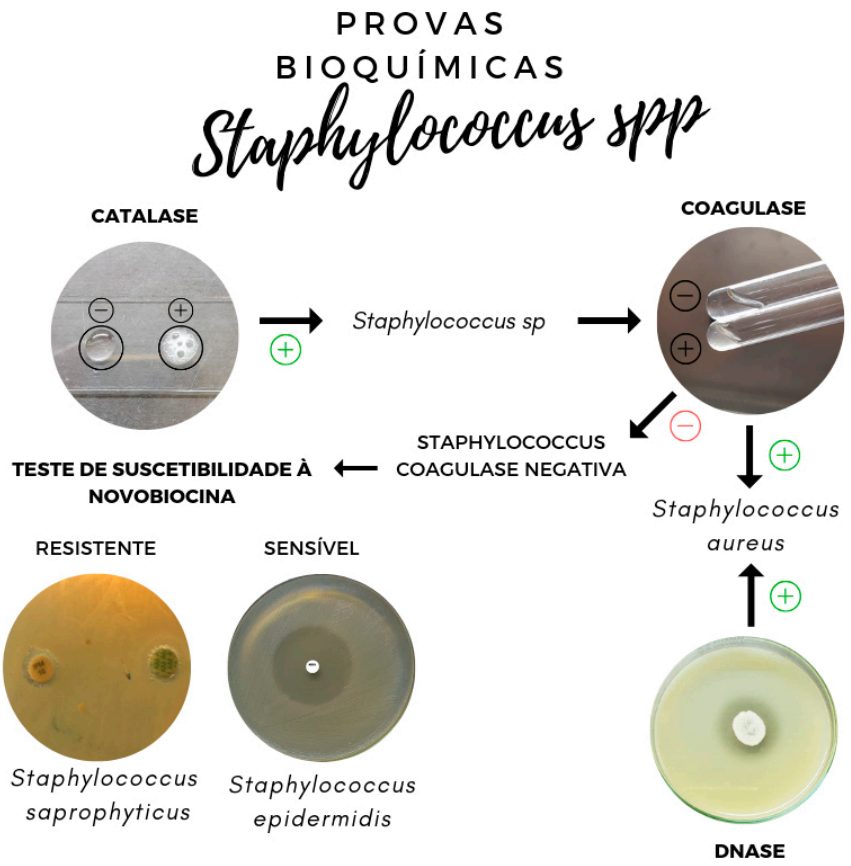

Figura 4. Provas bioquímicas para identificação de ***Staphylococcus spp***. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Explique por que o Ágar Manitol é seletivo e diferencial.
2. Por que o Ágar Manitol fica amarelo após o crescimento dos *S. aureus*?

Isolamento e Identificação de *Streptococcus* spp.

Introdução

O gênero *Streptococcus* é composto por bactérias Gram-positivas, esféricas (cocos), podem se apresentar em pares ou cadeias (diplococos). As colônias são discóides, mucóides, opacas ou brilhantes. Esses microrganismos são considerados fastidiosos, pois exigem condições especiais para o cultivo, tais como meios enriquecidos com sangue ou soro, microaerofilia e altas concentrações de dióxido de carbono (capnofílico). Os estreptococos são imóveis, não esporulados, mesófilos e a grande maioria anaeróbios facultativos. Além disso são fermentadores de carboidratos e apresentam perfil negativo para o teste da catalase, diferenciando-os dos *Staphylococcus* (MURRAY et al., 2009).

Trata-se de importantes patógenos humanos, com diferentes espécies dentro do grupo, sendo responsável por diversas patologias, como fasciíte necrosante (gangrena estreptocócica), impetigo, escarlatina, erisipela, síndrome do choque tóxico estreptocócico entre outras. Há três formas de diferenciar e classificar as bactérias desse gênero. A primeira é por propriedades sorológicas que são os grupos de Lancefield, apresenta uma classificação de A até W. A segunda é por perfil hemolítico (hemólise), podendo ser hemólise completa

(beta-β), hemólise incompleta (alfa-α) e ausência de hemólise (gama-γ). E a terceira classificação se baseia em características bioquímicas (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Isolar e identificar bactérias do gênero *Estreptococcus*.
- Visualizar as possíveis formas apresentadas pelos estreptococos.

Materiais

- Ágar sangue;
- Amostra a ser analisada (swab de orofaringe);
- Antibióticos: bacitracina (0,004 u) e optoquina;
- Peróxido de hidrogênio a 3%.

Metodologia

Semear a amostra em ágar sangue e picotar o meio para propiciar um ambiente microaerófilo, incubar por 24 a 48 horas a 37 °C. Logo após realizar a prova da catalase, que tem como princípio avaliar a presença da enzima através da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (formação de bolhas). Estreptococos é catalase-negativo.

Em relação ao padrão hemolítico, as bactérias podem comportar como β-hemolíticas, apresentando hemólise total das células sanguíneas (halo claro ao redor das colônias). O padrão α-hemolítico, apresenta hemólise parcial e forma-se um halo esverdeado ao redor das colônias, enquanto o γ-hemolítico não apresenta perfil de hemólise.

A espécie Streptococcus pyogenes, apresenta um perfil β-hemolítico e a confirmação pode ser realizada através do teste de sensibilidade a bacitracina. Já *S. pneumoniae*, apresenta um perfil de α-hemólise e são sensíveis a optoquina. O perfil γ-hemólise é sugestivo de *S. faecalis* (Figura 5).

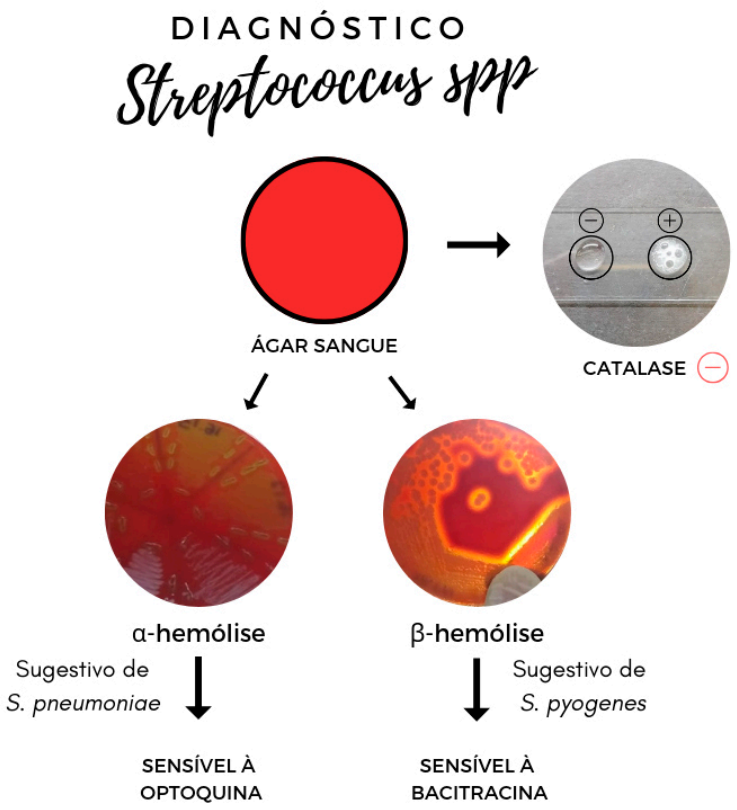

Figura 5. Esquema de identificação de ***Streptococcus spp***. **Fonte:** acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Classifique o perfil de hemólise das bactérias crescidas em ágar sangue.
2. Qual o nome da enzima que confere a propriedade hemolítica aos *Streptococcus pyogenes*?

Hemocultura

Introdução

Hemocultura é definida como a pesquisa de microrganismos patogênicos no sangue, utilizando meios de cultura específicos. A pesquisa de microrganismo é indicada quando se suspeita de endocardite, sepse, infecções hospitalares, febre de origem não definida, infecções em pacientes imunodeprimidos, meningites, pneumonias graves e bacteremia (OPLUSTIL et, 2004).

A bacteremia é definida como a presença de bactéria na corrente sanguínea e pode ser dividida em bacteremia primária e secundária. Bacteremia primária ocorre a partir da entrada direta do microrganismo na corrente sanguínea, através de agulhas, cateteres, infusões contaminadas. Bacteremia secundária é a disseminação de um microrganismo a partir de um foco primário de infecção (OPLUSTIL et al., 2004).

A bacteremia é classificada em transiente, intermitente e contínua. A bacteremia transiente é uma infecção transitória que pode ser totalmente eliminada com uma curta duração. A

bacteremia do tipo intermitente é uma infecção que foi eliminada, mas que houve recidiva, tendo intervalos variáveis de tempo. Já a bacteremia contínua é a infecção que não foi eliminada, sendo característica de endocardite (OPLUSTIL et al., 2004).

As principais bactérias causadoras de bacteremia são: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e bacilos gram-negativos.

Objetivos

- Compreender a técnica de hemocultura;
- Identificar os principais microrganismos causadores de bacteremia.

Materiais

- Amostras de sangue;
- Frascos de hemocultura.

Metodologia

Metodologia manual: é necessário no mínimo sete dias de incubação e agitação constante para um maior sucesso de isolamento em caso da presença do microrganismo, além disso é necessário pelo menos três subcultivos em meios de cultura enriquecidos. Os frascos devem ser mantidos em temperaturas que variam de 34°C a 36°C. Essa metodologia pode ser realizada de três formas: utilizando frascos convencionais ou frascos com dispositivos acoplados para isolamento de microrganismos ou lise-centrifugação. Não é a metodologia mais indicada, pois aumenta a chance de contaminação da amostra (OPLUSTIL et al., 2004) (Figura 6).

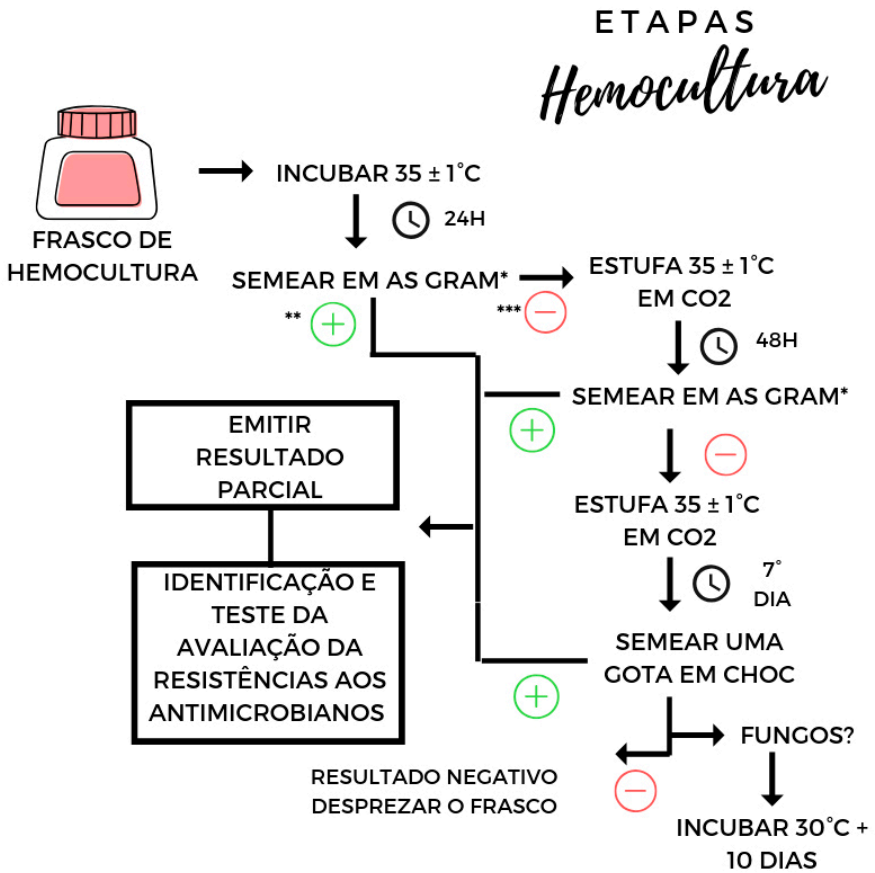

Figura 6. Processamento de hemoculturas por metodologia convencional. *Na presença de cocobacilos Gram-negativos semear também em CHOC; **ausência de crescimento no AS e/ou

CHOC, com presença de bactérias no Gram, proceder semeadura em anaerobiose; ***resultados preliminares das hemoculturas negativas e positivas devem ser emitidos após 24 horas. AS= ágar-sangue; CHOC= ágar-chocolate. **Fonte:** OPLUSTIL, 2010, p. 131. Imagem adaptada.

Metodologias automatizadas: apresentam maior eficiência e rapidez em relação a metodologia manual, menores chances de contaminação da amostra. Há diversos aparelhos automatizados para a realização dessas metodologias automatizadas (OPLUSTIL et al., 2004) (Figura 7).

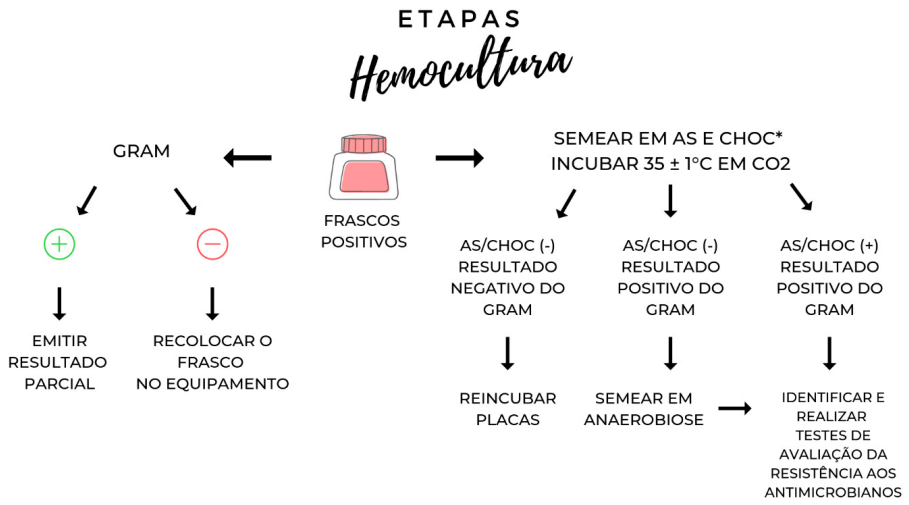

Figura 7. Procedimento para hemocultura por metodologias automatizadas. *Na presença de bacilos gram-negativos, semear também em ágar MacConkey; AS = ágar-sangue; CHOC = ágar-chocolate. **Fonte:** OPLUSTIL, 2010, p. 133. Imagem adaptada.

Questões para Estudo

1. Diferencie bacteremia transitória, intermitente e contínua.
2. Quais as principais espécies contaminantes das hemoculturas?

Isolamento e Identificação de *Enterococcus* spp.

Introdução

O gênero *Enterococcus* (cocos entéricos) apresenta mais de 25 espécies, dentre essas espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as mais importantes como patógenos humano. *Enterococcus* apresenta morfologia esférica (cocos) aos pares ou cadeias curtas. São microrganismos imóveis (embora alguns possam apresentar mobilidade), não esporulados, anaeróbios facultativos. Apresentam crescimento com ampla faixa de temperatura, de 10 °C a 45 °C, podem sobreviver em temperaturas de até 60 °C, além disso crescem em ampla faixa de pH e suportam elevada pressão osmótica. As colônias podem apresentar perfil hemolítico, sendo α-hemolíticas, β-hemolíticas ou γ-hemolíticas. São capazes de crescer na presença de concentrações elevadas de NaCl e sais biliares, essas características são utilizadas para distinguir enterococos de outros cocos Gram-positivos catalase negativos (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Isolar e identificar bactérias do gênero *Enterococcus*.

Materiais

- Ágar bile esculina;
- Ágar sangue;
- Alça bacteriológica
- Caldo de NaCl 6,5%;
- Lâmina;
- Peróxido de hidrogênio.

Metodologia

Os enterococos apresentam crescimento rápido em meios não seletivos, como ágar sangue e chocolate. Após o cultivo da bactéria em ágar sangue ou chocolate, o repique deve ser realizado em meios seletivos e diferenciais, no intuito de obter o diagnóstico confirmatório.

O meio de cultura utilizado para isolar enterococos é o ágar bile esculina, caldo NaCl 6,5% e púrpura de bromocresol. Este ágar tem a coloração inicial esverdeada e quando positivo (crescimento de enterococos) fica enegrecido. Em caldo NaCl 6,5% o crescimento da bactéria causa turbidez. O púrpura de bromocresol é feito em um tubo contendo glicose violeta, com coloração inicial púrpura e quando a bactéria fermenta fica amarelo (Figura 8).

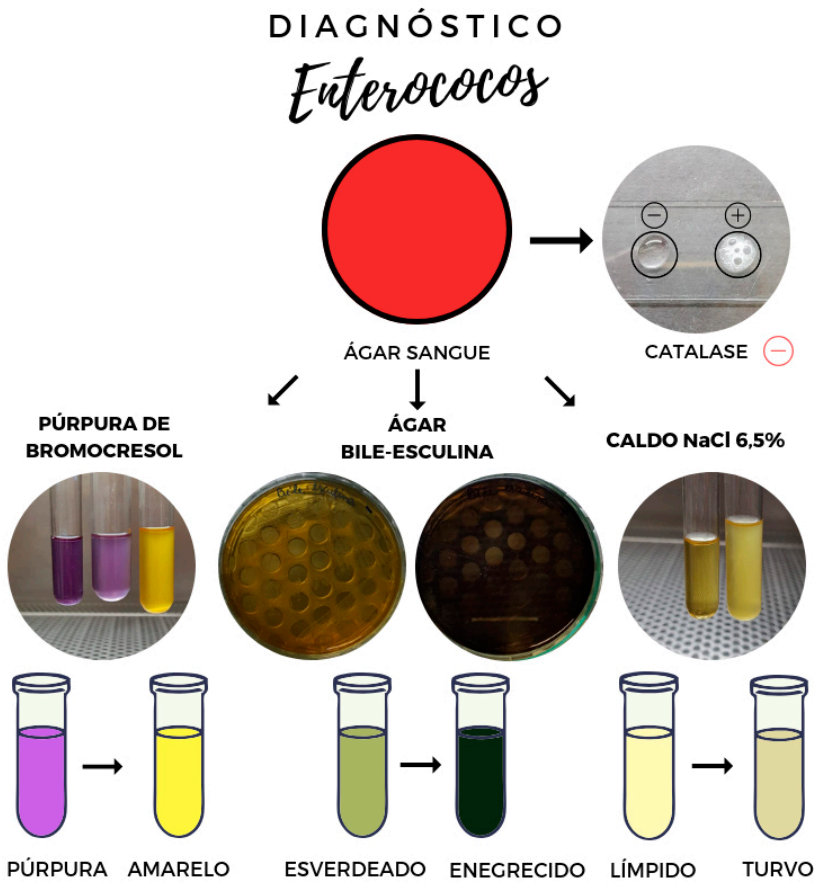

Figura 8. Esquema de identificação de ***Enterococcus*** spp. **Fonte:** OPLUSTIL, 2010, p. 133. Imagem adaptada.

Questões para Estudo

1. Quais as características que distinguem os enterococos dos demais cocos Gram positivo e catalase negativo.
2. Porque o ágar bile-esculina altera a sua coloração na cultura de enterococos?

Urocultura

Introdução

Essa técnica tem como o princípio o isolamento, identificação e quantificação de bactérias presentes na urina. A urocultura deve ser realizada quando há suspeita de infecção do trato urinário. As principais bactérias causadoras de infecção do trato urinário são: enterobactérias como, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. e cocos Gram-positivos como Staphylococcus spp. e Enterococcus spp. Nesse tipo de infecção geralmente apresenta grandes quantidades de leucócitos na amostra (piúria). Para o diagnóstico é preciso analisar tanto a quantidade elevada de leucócitos como a presença de bactérias na amostra (bacteriúria) (OPLUSTIL, et al., 2004).

Objetivos

- Compreender os princípios da técnica de urocultura;
- Descrever as bactérias mais frequentes encontradas nas infecções urinárias.

Materiais

- Alças calibradas;
- Amostra de urina, preferencialmente de jato médio, e em situações especificas pode utilizar urina de primeiro jato, urina de paciente com sonda vesical e urina coletada por punção suprapúbica;
- Meios de cultura (MacConkey e Cled).

Metodologia

Antes da coleta da amostra é necessário fazer a correta higienização do local. O material clínico para realizar essa cultura deve ser a urina jato médio e antes da antibioticoterapia em frasco esterilizado. O transporte deve ocorrer na temperatura de 20 °C a 25 °C e o processamento realizado em até duas horas. Se não for possível processar nesse período a amostra deve ser refrigerada 2 °C a 8 °C por no máximo 24 horas. O ácido bórico pode ser utilizado quando se deseja conservar e transportar as amostras em temperatura ambiente por até 24 horas. Para realizar a cultura é recomendado um volume de 2 mL e para uranálise um volume de 10 mL.

A microscopia é realizada a partir da coloração de Gram, sendo necessário homogeneizar a amostra sem centrifugar, em seguida colocar 10 µL da urina em uma lâmina, sem espalhar; fixar pelo calor e proceder com a coloração. Após analisar no microscópio, o resultado é reportado através do número de microrganismos encontrados, podendo ser raros, alguns ou numerosos.

A cultura pode ser realizada de duas formas, por meio de semeadura semiquantitativa em placa e lâmina-cultivo.

Semeadura semiquantitativa em placa:

1. Homogeneizar a amostra sem centrifugar;
2. Imergir a alça calibrada de 0,01 mL ou 0,001 mL na urina na vertical;
3. Semear quantitativamente em placa com ágar MacConkey e Cled;
4. Incubar em temperaturas entre 34 °C e 36 °C por 18 a 24 horas;
5. Fazer a leitura e relacionar com a microscopia.

Interpretação:

- Crescimento com alça de 0,001 mL ou 1 μL (1:1000) = 1 colônia = 1000 ou 103 UFC/mL.
- Crescimento com alça de 0,01 mL ou 10 μL (1:100) = 1 colônia = 100 ou 102 UFC/mL.

Como reportar o resultado:

- UFC/mL;
- Informar o método utilizado na coleta de urina;
- Em caso de dúvida = repetir;
- Cultura negativa = não houve crescimento de microrganismos;
- Cultura positiva = 100.000 UFC/mL de *E. coli*

Questões para Estudo

1. Quais os principais agentes etiológicos de infecções do trato urinário?
2. Por que a cultura deve ser realizada com a primeira urina da manhã e de jato médio?

Anaeróbios

Introdução

Cultura em anaerobiose é realizada com microrganismos capazes de sobreviver e de multiplicar na ausência de oxigênio. Os principais microrganismos causadores de infecções anaeróbicas são: *Bacterioides* do grupo *fragilis*, *Peptostreptococcus*, bacilos Gram-negativos (*Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp.) e fusobactérias. Essas bactérias podem causar infecções como, apendicite, bacteremia, otite média, sinusite e infecções pós-cirúrgicas (OPLUSTIL et al., 2004).

A infecção por anaeróbios tem algumas características como odor fétido, grânulos de enxofre, presença de gás, cor vermelho tijolo e necrose (OPLUSTIL et al., 2004).

Objetivos

- Isolar e identificar microrganismos anaeróbios.

Materiais

- Amostra clínica;

- Câmara de anaerobiose;
- Meios de cultura.

Metodologia

O material clínico adequado para esse tipo de cultura é uma amostra aspirada com agulha e seringa ou fragmentos de tecido infectado. A coleta deve ser feita antes do uso de antimicrobianos. O transporte deve ser realizado em no máximo 2 horas após a coleta e em temperatura ambiente. Algumas amostras como swab de orofaringe, nasofaringe, gengiva e material de ferida superficial não são aceitáveis.

O diagnóstico de bactérias anaeróbias é realizado pelo exame macroscópico, exame microscópico e cultura.

- **Exame macroscópico da amostra:** Algumas características são: odor fétido, presença de gás, cor vermelho-tijolo após exposição à luz ultravioleta, grânulos de enxofre e presença necrose.
- **Exame microscópico da amostra:** É utilizada a coloração de Gram, evidenciando algumas características particulares de cada microrganismo:
    - Bacilos Gram-negativos com presença de esporos – sugestivo de *Clostridium* spp.;
    - Bacilos Gram-positivos largos, sem presença de esporos – sugestivo de *Clostridium perfringens*;
    - Cocobacilos Gram-negativos – sugestivo de *Prevotella* ou *Porphyromonas*;
    - Bacilos Gram-negativos finos com extremidades afiladas – sugestivo de *Fusobacterium* spp.;
    - Cocos gram-negativos pequenos – sugestivo de *Veillonella* spp.
- **Preparo do material e inoculação nos meios de cultura**
    1. Amostras purulentas – homogeneizar o material para assegurar uma distribuição adequada dos microrganismos e semear em placas ou em frasco de hemocultura anaeróbio;
    2. Amostras de tecido – triturar a amostra em aproximadamente 1 mL de meio líquido tioglicolato (THIO) anaeróbio e inocular em placas e no caldo THIO anaeróbio;
    3. Amostra de líquidos orgânicos – semear em placas e em caldo THIO anaeróbio ou em frasco de hemocultura anaeróbia;
    4. Medula óssea – deve ser inoculada diretamente em frasco de hemocultura anaeróbia;
- **Jarra de anaerobiose** – Trata-se de uma jarra de acrílico com tampa de fechamento hermético. Para a formação de uma atmosfera de anaerobiose utiliza-se um gerador de CO_2, que poder ser um envelope ou uma placa plástica. Em sala de aula, utiliza-se uma vela para consumir todo o oxigênio e fornecer um ambiente anaeróbico (Figura 9).

Figura 9. Ilustração de Jarra de Anaerobiose e de Câmara de Anaerobiose. **Fonte:** Acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Por que o oxigênio é letal para as bactérias anaeróbias estritas?
2. O que explica a maior frequência de infecções causadas por anaeróbios estritos em relação a aeróbios e anaeróbios facultativos?

Leitura de Lâminas de Ziehl-Neelsen

Introdução

O gênero *Mycobacterium* compreende bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos. A parede celular desses microrganismos é complexa e rica em lipídios, o que torna a superfície hidrofóbica. Esse gênero é resistente a soluções ácidas descorantes, apresenta crescimento lento (cerca de 8 semanas para detectar em culturas), são resistentes a detergentes e a alguns antibióticos (MURRAY et al., 2009).

A coloração de Ziehl-Neelsen baseia-se na supracitada capacidade das micobactérias resistirem a soluções ácidas descorantes devido à composição altamente lipídica da parede celular. Sendo assim, após um processo de coloração especial, a quente, uma vez coradas, não sofrem ação de descorantes fortes, como a solução de álcool-ácido. Deste modo, a fucsina de Ziehl cora todas as bactérias de vermelho e após a descoloração com álcool-ácido, somente os bacilos álcool-ácido resistentes (B.A.A.R.) conservarão esta cor. Em seguida cora-se o fundo com azul de metileno, criando um contraste nítido entre elementos celulares e outras bactérias (azuis) e os B.A.A.R (vermelhos) (Figura 10).

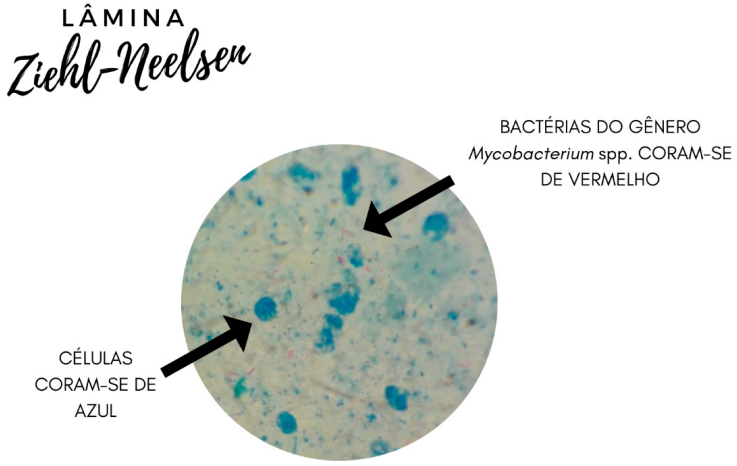

Figura 10. Microscopia demonstrando lâmina de Ziehl-Neelsen. **Fonte:** Acervo próprio.

Objetivos

- Compreender o princípio da coloração de Ziehl-Neelsen;
- Analisar a lâmina e verificar a presença ou não de micobactérias.

Materiais

- Álcool-ácido a 1%;
- Amostra clínica (secreções do trato respiratório inferior, biópsias, tecidos, líquidos em geral e fezes);
- Azul de metileno a 10%;
- Fucsina de Ziehl-Neelsen;
- Óleo de imersão.

Metodologia

- Preparo do esfregaço (espalhar a amostra com alça bacteriológica sobre a lâmina e fixar com calor, passando sobre chama do bico de Bunsen de 2 a 3 vezes até completa secagem do esfregaço);
- Fixar pelo calor;
- Cobrir com fucsina de Ziehl;
- Aquecer a parte inferior da lâmina, até emissão de vapores;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir o esfregaço com álcool-ácido 1% e deixar por 1 minuto;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir com azul de metileno 10% e deixar por 2 minutos;
- Lavar com água corrente;
- Secar;
- Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100X) (Figura 11).

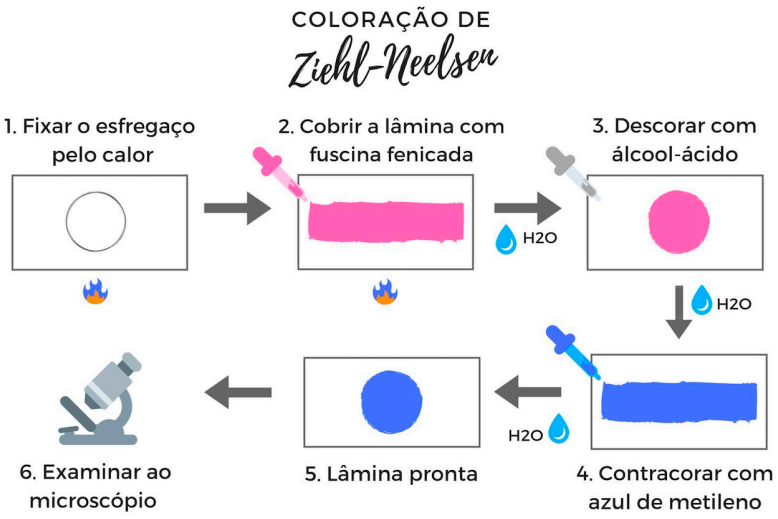

Figura 11. Etapas da coloração de Ziehl-Neelsen. **Fonte:** Acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Explique detalhadamente a composição da parede celular das micobactérias.
2. Por que as micobactérias resistem aos métodos de coloração comuns?

Coprocultura

Introdução

A coprocultura é o exame mais utilizado para a pesquisa de agentes bacterianos em fezes. Os principais gêneros bacterianos relacionados com as gastroenterites incluem *Salmonella, Shigella, Escherichia, Staphylococcus, Aeromonas, Plesiomonas, Yersinia* e *Campylobacter*. Apesar da sua sensibilidade, esse teste apresenta diversas limitações, principalmente relacionada a forma de coleta da amostra. As fezes devem ser colhidas na fase aguda (diarréicas), em frascos estéreis ou em swabs com meio de transporte contendo conservante específico (Carry-Blair). As fezes devem ser encaminhadas ao laboratório, preferencialmente até duas horas após a coleta, na presença de conservante em temperatura ambiente. A amostra permanece estável por até 48 horas se conservada no meio de transporte (Carry-Blair), sob refrigeração (2-8ºC). O uso prévio de antibióticos ou antidiarréicos também pode interferir na coprocultura. Na maioria dos laboratórios clínicos são utilizados meios de cultivo seletivos para pesquisa de *Salmonella, Shigella, Escherichia, Staphylococcus, Aeromonas* e *Plesiomonas*. A pesquisa de *Yersinia* e *Campylobacter* é realizada apenas quando ocorre a solicitação específica pelo profissional. Este procedimento pode impactar na sensibilidade da coprocultura, devido à grande incidência de *Campylobacter* associada a processos gastroentéricos (FILHO, 2013).

Objetivos

- Entender a finalidade da coprocultura;
- Identificar as principais bactérias isoladas.

Materiais

- Amostra clínica;
- Conservantes (Glicerina tamponada ou Cary-Blair);
- Meios de cultura

Metodologia

Meios de transporte:

- Salina glicerinada e tamponada é indicada para *Salmonella* e *Shigella*.
- *Cary Blair* é indicado para todos os patógenos bacterianos intestinais, exceto *Shigella*.
- Fezes e aspirados gastrointestinais podem ser transportados sob refrigeração em frascos estéreis e biópsias podem ser conservadas com um pouco de salina em frasco estéril.

Rotina recomendada (quando não houver informações clínicas ou pedido específico):

Salmonella, Shigella, Aeromonas, Plesiomonas, Yersinia: podem ser isolados em Mac Conkey e Salmonella-Shigella. Recomenda-se também incluir a cultura para *Campylobacter*, que exige meio específico. No caso de fezes com sangue, pesquisar EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica).

Em coprocultura de crianças até 1 ano de idade considera-se rotina a pesquisa de *Salmonella, Shigella*, EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora) e EHEC. Deve-se incluir também a pesquisa de *Yersinia enterocolítica, Aeromonas* e *Plesiomonas*.

Características de alguns meios sólidos:

- Ágar MacConkey e Ágar Eosin Metilene Blue (EMB) são meios diferenciais, mas não seletivos entre os Gram negativos entéricos.
- O Ágar Salmonella-Shigella funciona bem para *Salmonella*, mas pode inibir Shigella.
- O Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) é recomendado para *Salmonella* e *Shigella*, mesmo as mais exigentes.
- Ágar Hektoen entérico (HE) é adequado para *Salmonella* e *Shigella*
- Ágar verde brilhante (VB) é seletivo para *Salmonella sp*, mas não é indicado para *Salmonella typhi* e *S. paratyphi*.
- Ágar sulfito de bismuto (Wilson & Blair) é seletivo para *Salmonella*.

Caldos de enriquecimento:

Indicado para detectar baixo número de *Salmonella* ou *Campylobacter* em portadores. Muitos laboratórios estão abandonando o uso de caldos de enriquecimento pela baixa recuperação de patógenos.

- Caldo GN (Gram Negativo) - enriquecimento de *Salmonella* e *Shigella spp*.
- Caldo Selenito F - principalmente *Salmonella spp*.
- Caldo tetrationato - apenas algumas espécies de *Salmonella spp*. e exclui *S. typhi*.

- Campy-tioglicolato - apenas para pesquisa de portadores de *C. jejuni*.
- Salina fosfatada e tamponada pH 7,6 - para semear fezes e conservar em geladeira por três semanas para pesquisa de portadores de *Yersinia enterocolitica*, mas não indicado para rotina.

QUADRO 1 - PROCEDIMENTOS GERAIS PARA O ISOLAMENTO DOS PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS DE INFECÇÃO INTESTINAL

***USO DE CALDOS DE ENRIQUECIMENTO É FACULTATIVO. FONTE: LEVY (2004).**

Bactéria	Método	Enriquecimento	Meios de cultura
Campylobacter, C. jejuni	Culturas incubadas em ambiente microaerófilo a 42 ºC	Não	Ágar p/ *Campylobacter* com suplementos de antibióticos como o meio de Skirrow, Campy-BAP (Blaser), etc.
Escherichia coli Enteropatogênica, *E. coli* Invasora	24-48 h aerobiose, 35-37 oC	Não	Ágar MacConkey ou Ágar eosina azul de metileno.
E. coli enterohemorrágica O157:H7 e outras	24-48 h aerobiose, 35-37 oC	Não	Ágar diferencial: Ágar MacConkey sorbitol (SMAC) ou Ágar Mac Conkey.
Salmonella spp.	24-48 h aerobiose, 35-37 oC	Selenito F *, Caldo tetrationato *, Caldo GN*.	Ágar Salmonella-Shigella, MacConkey ou Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) ou Ágar Hektoen enterico (HE).
Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus	24-48 h aerobiose, 35-37 oC	Água peptonada alcalina por 6-12 h	Ágar TCBS, cresce em Mac Conkey.
Yersinia enterocolitica	-	Salina glicerinada tamponada 4-5 ºC por três semanas, não recomendado.	Ágar Salmonella-Shigella, Ágar MacConkey e meio seletivo: Ágar cefsulodina- irgasan-novobiocina.

Questões para Estudo

1. Quais as limitações da coprocultura?
2. Por que o ágar Salmonella-Shigella é um meio seletivo e diferencial?

Isolamento de Enterobactérias

Introdução

A família *Enterobacteriaceae* compreende um vasto grupo heterogêneo de bactérias de grande importância médica. São bastonetes ou cocobacilos Gram-negativos, distribuídos amplamente pela natureza (ubíquos) e fazem parte da microbiota normal da maioria dos animais, inclusive do homem. Podem causar diversas doenças em humanos, como diarreia, pneumonia, infecção do trato urinário (ITU), infecção do trato respiratório (ITR), bacteremias, meningite e dentre outras.

Apresentam motilidade variável, anaeróbios facultativos e não esporulados. São positivas para o teste da catalase, fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são oxidase negativos, reduzem nitrito a nitrato, possuem exigências nutricionais simples, crescem de forma satisfatória em meios seletivos e não seletivos. São bactérias resistentes a sais biliares e apresentam na parede celular seu principal antígeno, o lipopolissacarídeo (LPS), que é

composto por três partes: o antígeno O (mais externo), um cerne polissacarídeo (mais central) e o lipídeo A (mais interno) e com atividade de endotoxina (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Realizar o isolamento e a diferenciação entre as espécies de Enterobactérias;
- Compreender os princípios dos meios de cultura e os testes bioquímicos utilizados.

Materiais

- Ágar Citrato de Simmons (CITRATO);
- Ágar Fenilalanina (FA);
- Ágar MacConkey;
- Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM);
- Ágar Tríplice-Ferro (TAF);
- Alça bacteriológica;
- Amostra de colônias isoladas de enterobactérias;
- Bico de Bunsen;
- Caldo Ureia de Stuart (UREIA);
- Caldo Vermelho de Metila (VM).

Metodologia

Ágar MacConkey: meio seletivo para Enterobactérias é composto por lactose, sais biliares e cristal violeta. O meio é diferencial pela presença da lactose e seletivo pela presença dos sais biliares e cristal violeta, que são inibidores de Gram-positivas. As bactérias lactose positivas crescem no ágar com a coloração das colônias rosa ou vermelha, já as lactoses negativas ficam com as colônias incolores, uma vez que não fermentam a lactose e sim a peptona, convertendo-a em amônia (Figura 12).

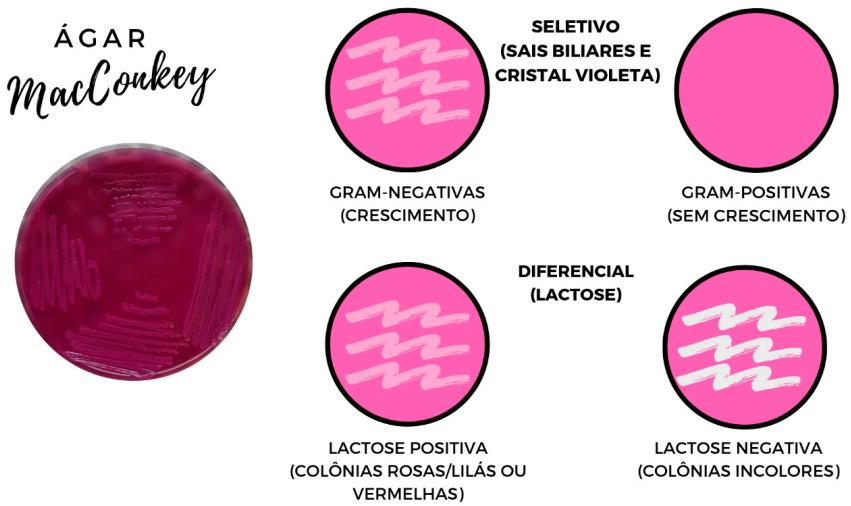

Figura 12. Isolamento de enterobactérias no Ágar MacConkey. **Fonte:** Acervo próprio.

Ágar Tríplice-Ferro (TAF): meio composto por três açúcares: lactose, sacarose e glicose. Este meio possui indicador de pH vermelho de fenol que em meio ácido muda sua coloração de vermelho para amarelo, ou seja, se bactéria fermentar algum dos açúcares o meio tem sua coloração alterada. Por meio deste procedimento podem ser avaliados três parâmetros: fermentação de carboidratos, produção de sulfeto de hidrogênio (meio fica enegrecido) e produção de gás (forma-se espaço no tubo). Por convenção a leitura da prova é realizada do ápice para a base. **A**= ácido, **K**= alcalino (Figura 13).

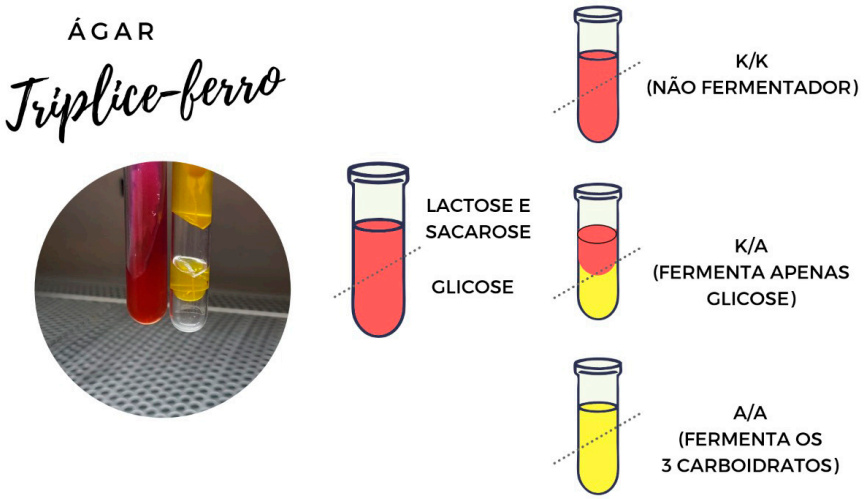

Figura 13. Esquema ilustrativo do Ágar Tríplice-Ferro (TAF). **Fonte:** Acervo próprio.

Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM): meio semi-sólido que permite avaliar se a bactéria sintetiza a enzima triptofanase. Esta enzima sintetizada pela bactéria é capaz de metabolizar o triptofano em indol, que é evidenciado pela formação de um anel vermelho após a adição do reativo de KOVACS. Este procedimento possibilita também verificar a produção de sulfeto de hidrogênio (meio fica com coloração enegrecida) e a motilidade (turbidez) (Figura 14).

Figura 14. Esquema ilustrativo do Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade. **Fonte:** Acervo próprio.

Ágar Citrato de Simmons (CITRATO): meio utilizado para identificação de bactérias que utilizam o citrato com única fonte de carbono. O meio tem a coloração inicial verde, se a bactéria metabolizar o citrato presente no meio, ele ficará azul devido ao indicador azul de bromotimol. A mudança de cor ocorre pela alcalinização do meio (Figura 15).

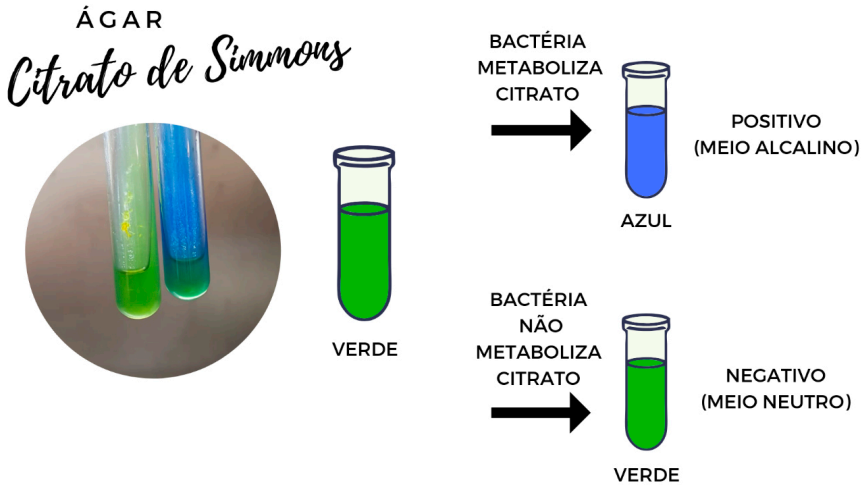

Figura 15. Esquema ilustrativo do Ágar Citrato de Simmons. **Fonte:** Acervo próprio.

Caldo Ureia de Stuart (UREIA): esse meio é utilizado para avaliar se a bactéria é produtora da enzima urease. A ureia presente no meio é degradada pela enzima urease em duas moléculas de amônia. A amônia formada alcaliniza o meio e o indicador de pH, vermelho de fenol, presente no meio, se torna rosa. pH. Originalmente o meio tem a cor âmbar e após a alcalinização se torna rosa (Figura 16).

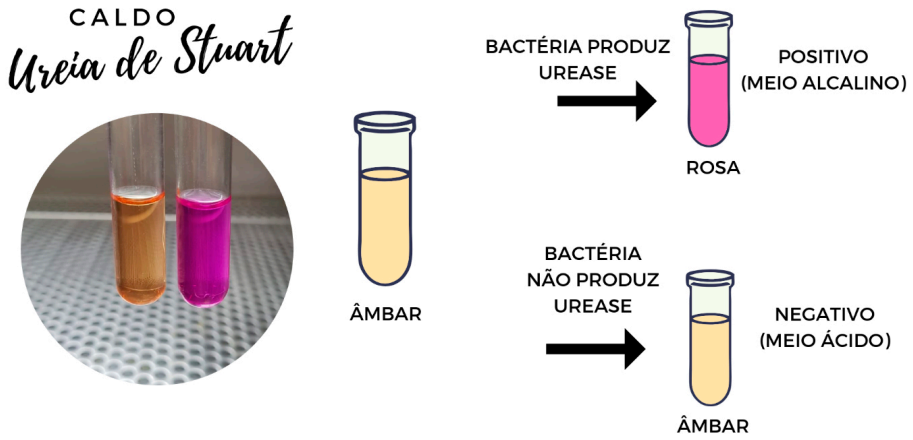

Figura 16. Esquema ilustrativo do Caldo Ureia de Stuart. **Fonte:** Acervo próprio.

Ágar Fenilalanina (FA): meio utilizado para diferenciação de bacilos entéricos quanto à capacidade de produzir ácido fenilpirúvico a partir da desaminação da fenilalanina por ação enzimática. O meio é incolor e se os bacilos entéricos forem FA positivos, o meio apresentará uma coloração esverdeada na superfície após a adição do cloreto férrico (Figura 17).

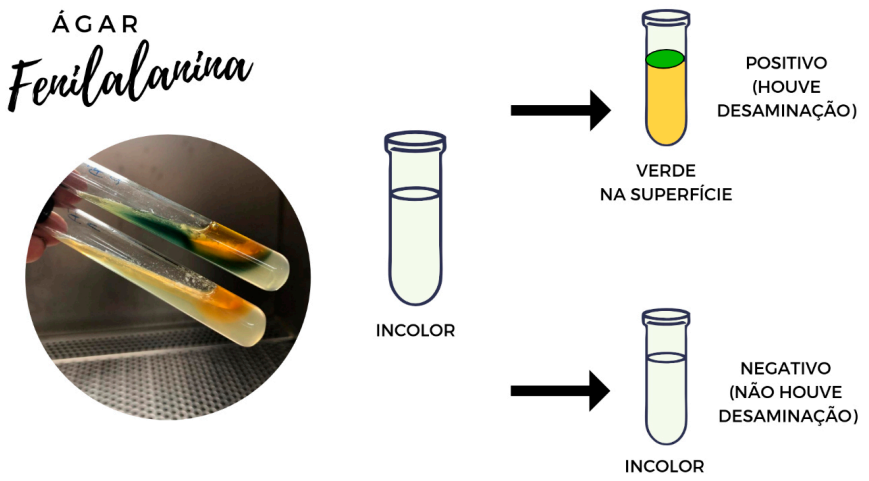

Figura 17. Esquema ilustrativo do Ágar Fenilalanina. **Fonte:** Acervo próprio.

Caldo Vermelho de Metila (VM): teste para identificar espécies bacterianas fortes fermentadoras, a partir da glicose. O meio tem a cor inicial amarelo, se a bactéria for uma forte produtora de ácidos ficará vermelho, em função da presença do indicador de pH vermelho de metila. O ponto de viragem deste meio é o pH 4,4 (Figura 18).

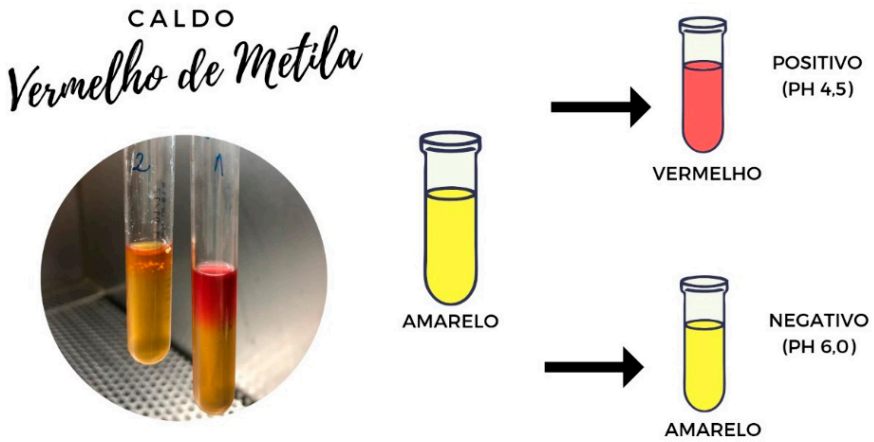

Figura 18. Esquema ilustrativo do Caldo Vermelho de Metila. **Fonte:** Acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Explique por que o Ágar MacConkey é seletivo e diferencial?
2. Explique o princípio dos meios utilizados para identificação das enterobactérias.

Identificação de *Pseudomonas* spp.

Introdução

O gênero *Pseudomonas* leva esse nome pois estão dispostas em pares de células que lembram uma única célula. Apresentam positividade para o teste da oxidase, são móveis e

possuem exigências nutricionais mínimas. São microrganismos Gram-negativos, ubíquos, aeróbios, toleram variações ambientais e crescem em temperaturas que variam de 4 °C a 42 °C. Possui inúmeros fatores de virulência, como toxinas (exotoxina A e S), enzimas (elastase, protease, fosfolipase C), alginato e uma cápsula de polissacarídeos. Algumas cepas podem produzir pigmentos difusíveis como pioverdina e piocianina (MURRAY et al., 2009).

Objetivos

- Realizar o isolamento e identificação de Pseudomonas.

Materiais

- Bactéria a ser isolada;
- Meios de cultura.

Metodologia

O primeiro passo é a coloração por Gram. Utiliza-se também o meio OF (meio para oxidação e fermentação), que serve para avaliar a oxidação ou fermentação por parte da bactéria. Tem como cor original o verde com indicador de pH azul de bromotimol e pode adquirir as colorações: amarelada se a bactéria realizar oxidação (meio ácido), coloração azulada (meio alcalino) ou não ter alteração de cor (meio neutro). Na presença de *Pseudomonas* o topo do tubo fica amarelo, mostrando que houve acidificação do meio por oxidação, e o resto do tubo continua com a cor original. O Caldo Ureia de Stuart (Ureia), apresenta coloração inicial amarelada, se a bactéria produzir a enzima urease, esta hidrolisa a ureia em duas moléculas de amônia, o meio fica alcalino e observa-se a mudança para a cor rosa. A *Pseudomonas*, nesse meio, apresenta coloração amarelada, pois não é uma bactéria produtora de urease. O Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM), com coloração inicial amarelada, avalia se bactéria tem a capacidade de metabolizar triptofano em indol, sendo evidenciado a formação de um anel vermelho após a adição do reativo de KOVACS. No SIM também é verificado se a bactéria produz sulfeto de hidrogênio (meio fica enegrecido) e a motilidade (turbidez). A *Pseudomonas* apresenta motilidade, por este motivo o meio fica turvo; não produz sulfeto de hidrogênio, portanto a coloração inicial do meio não se altera. Além disso, a bactéria não metaboliza o triptofano, não tendo assim a formação de indol (anel vermelho). São bactérias DNAse negativas. O Caldo Tioglicolato avalia o crescimento de microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e microaerófilos. Nesse caldo é adicionado a resazurina, um indicador de presença de oxigênio, que é observada pela cor rosa na parte superior do tubo (contato com o oxigênio). Bactérias aeróbias crescem na superfície do meio, bactérias anaeróbias crescem no fundo do caldo e bactérias microaerófilas crescem entre o meio mais oxigenado e o menos. Como *Pseudomonas* são microrganismos aeróbios, eles evidenciam um crescimento na superfície do Caldo, apresentando turbidez (OPLUSTIL, et al., 2004).

Para *Pseudomonas aeruginosa* há um meio seletivo e diferencial que é o ágar cétrimide. O meio é seletivo, pois na sua composição tem a cetrimida, um composto quaternário de amônio que inibe o crescimento de muitas bactérias, inclusive espécies de *Pseudomonas*, exceto *Pseudomonas aeruginosa*. Ele é diferencial por apresentar cloreto de magnésio e sulfato de potássio que promove a produção de piocianina, na presença de P. aeruginosa. Este meio possui coloração inicial âmbar e na presença da bactéria fica azul ou azul esverdeado. O ágar cétrimide promove o aumento de produção de piocianina, sendo a P. aeruginosa a única espécie de *Pseudomonas* e de bactérias Gram-negativas que excreta piocianina (Figura 19).

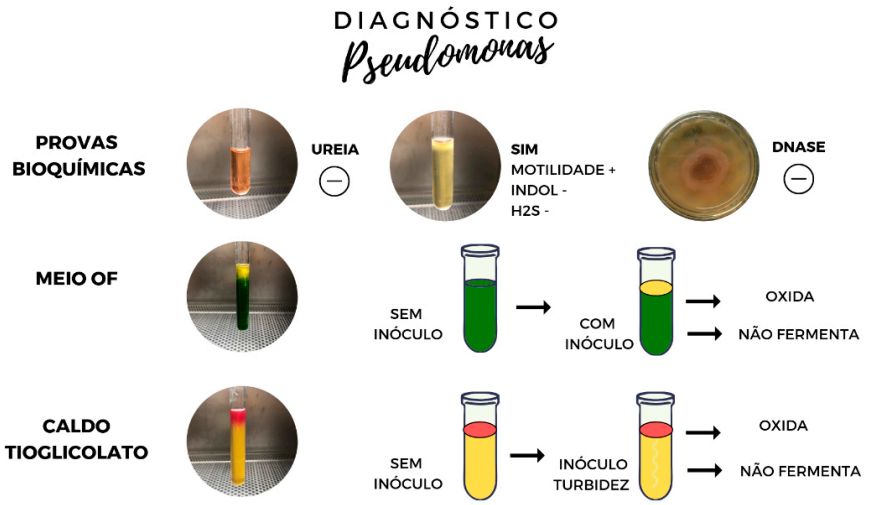

Figura 19. Esquema de identificação ***Pseudomonas*** spp. **Fonte:** Acervo próprio.

Questões para Estudo

1. Por que o ágar cétrimide é um meio seletivo e diferencial para *Pseudomonas aeruginosa*?
2. Qual a principal diferença entre *Pseudomonas* e Enterobactérias?

Cultura de Secreção Genital

Introdução

Diversas patologias podem ocorrer no trato genital e podem ter etiologia bacteriana, fúngica, parasitárias e viral. Muitas dessas infecções são assintomáticas, passando despercebidas pelo paciente. A suspeita clínica deve ser bem definida, uma vez que, diversos agentes podem causar esse tipo de infecção, sendo necessário o diagnóstico correto no intuito de estabelecer o melhor tratamento para a infecção. As doenças mais comuns no sexo feminino são vulvovaginite, vaginose bacteriana, cervicite, doença inflamatória pélvica (DIP) e lesões genitais. Já no sexo masculino as principais são uretrite, prostatite e lesões genitais. A coleta adequada é de suma importância para o sucesso no diagnóstico correto (OPLUSTIL et al., 2004).

Muitos microrganismos colonizam normalmente essa região, porém variações hormonais podem fazer com que bactérias da microbiota normal passem a ser consideradas patogênicas. Essa variação ocorre em recém-nascido, durante puberdade e gravidez e em outras situações.

Objetivos

Conhecer quais as reais necessidades desse tipo de cultura;

Saber como realizar a coleta e a cultura;

Aprender sobre as principais bactérias que colonizam o trato genital.

Materiais

- “Swab”;
- Alça bacteriológica;

- Amostra;
- Kit de coloração.
- Lâminas e lamínulas;
- Meios de cultura.

Metodologia

A coleta da amostra pode ser realizada com "swab" convencional, sendo armazenada em temperatura de 20 °C a 25 °C e tendo viabilidade de duas horas. Se for necessário o transporte, utiliza-se um "swab" com meio de transporte, em temperaturas de 20 °C a 25 °C, nessas condições a viabilidade da amostra é de doze horas.

A microscopia pode ser realizada por exame direto a fresco. Inicialmente é colocada uma gota da amostra sobre uma lâmina, fixada pelo calor e em seguida submetida a coloração de Gram. A lâmina é observada ao microscópio na objetiva de 40X (Figura 20).

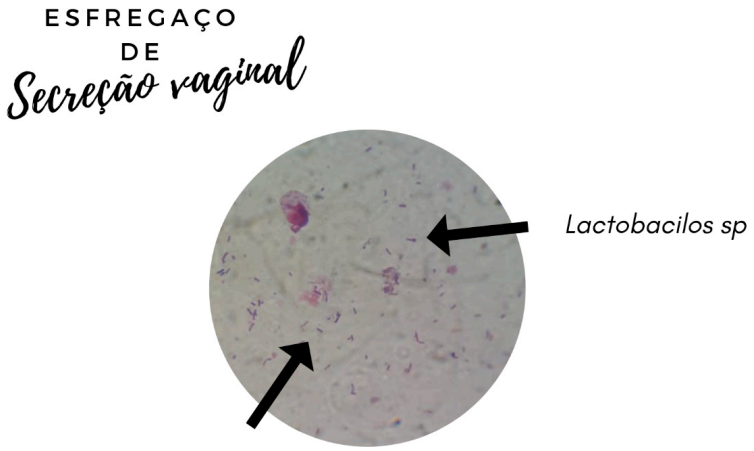

Figura 20. Lâmina de secreção genital. **Fonte:** Acervo próprio.

Cultura

- **Semeadura das amostras colhidas em "swab":** rolar o "swab" em uma pequena área das placas AS (Ágar sangue) e TM (Ágar Thayer-Martin) e mergulhá-lo no caldo TODD (Caldo TODD-Hewitt) no caso de pesquisa de estreptococos do grupo B, nessa sequência; estriar as placas com alça bacteriológica em três direções diferentes.
- **Semeadura das amostras colhidas por punção:** Colocar primeiro uma gota da amostra em meio líquido (THIO) e, a seguir, uma gota nas placas de MC (MacConkey), AS (Ágar sangue), ASANA (Ágar Sangue Anaeróbio) e TM (Ágar Thayer-Martin) e, por último, confeccionar um esfregaço para o exame microscópico. Iniciar a semeadura a partir do meio não seletivo em três direções diferentes.
- **Semeadura das amostras quantitativas:**
    1. Esperma ou líquido prostático
        - Homogeneizar a amostra.
        - Imergir a alça calibrada de 0,01 mL (1:100) na amostra, de forma vertical.
        - Semear em AS e TM pela técnica quantitativa.
        - Interpretação: alça de 0,01 mL (1:100) - 1 colônia = 100 ou 102 UFC/mL.

2. Urina de 1° jato
    - Centrifugar 10 mL de urina a 1.500 rpm por 5 minutos.
    - Retirar 9 mL do sobrenadante e semear o sedimento com alça calibrada de 0,01 mL em AS e TM.
    - Interpretação: alça de 0,01 mL (1:100) – 1 colônia = 100 ÷ 10 (concentração da amostra por centrifugação) ou 10 UFC/mL.

- Temperatura e tempo de incubação
    - Após a semeadura, incubar as placas de AS e TM em estufa de CO_2, os meios líquidos e o MC em estufa aeróbia a 35 ± 1 °C por até 72 horas, com leitura diária.

Questões para Estudo

1. O que pode causar a variação da microbiota? E em quais casos isso acontece?
2. Como deve ser a coleta adequada para esse procedimento?

Cultura de Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

Introdução

A meningite é um processo inflamatório das meninges, considerado um dos agravos mais comuns do sistema nervoso central. Pode ser causada por agentes infecciosos, como vírus, fungos e bactérias, ou por processos como, ação de medicamentos e neoplasias. Devido a sua gravidade exige diagnóstico rápido e preciso. A cultura do líquor e a identificação do agente etiológico é um importante auxílio para o diagnóstico. O líquor ou líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido corporal estéril e incolor encontrado no espaço subaracnóideo do cérebro, entre as meninges aracnoide e pia mater, e da medula espinhal (OPLUSTIL et al., 2004).

Para a coleta de líquor, o ideal é utilizar pelo menos três tubos: quando não há indicação específica no pedido, o primeiro deve seguir para a bioquímica (não é o indicado para a cultura, pois é mais propício a contaminação); o segundo, para microbiologia e testes sorológicos; o terceiro, para hematologia; e outros tubos, para demais procedimentos. Essa coleta deve ser feita em hospital por especialistas, antes de se iniciar terapia com antimicrobianos. A amostra clínica para cultura deve ser encaminhada de imediato ao laboratório, ou no prazo máximo de 3 h, sempre em temperatura ambiente. Amostras com volume superior a 1 mL devem ser centrifugadas. Com o sedimento realiza-se a bacterioscopia e semeadura, enquanto destina-se o sobrenadante à execução das provas de detecção de antígenos bacterianos (LEITE et al., 2016).

Na meningite bacteriana, a transmissão é interpessoal, pelas vias respiratórias, por meio de gotículas e secreções do nariz e da garganta. Três espécies podem causar meningites bacterianas em mais de 70% dos casos: *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. O líquor nessas meningites apresenta aspecto turvo, aumento de polimorfonucleares (neutrófilos) (>1.000/mL), aumento de proteínas (>100 mg/mL) e hipoglicorraquia (LEITE et al., 2016).

Objetivos

- Conhecer quais os procedimentos envolvidos nas etapas da cultura de líquor;

- Reconhecer quando se deve realizar esse tipo de cultura.

Materiais

- Ágar sangue de carneiro 5% (ASA);
- Alça bacteriológica;
- Centrífuga citológica (citocentrífuga).
- Centrífuga;
- Lâminas de microscópio novas e limpas;
- Reagentes para coloração de Gram;
- Tioglicolato (TIO);
- Tubo cônico estéril;
- Tubos com tampa de rosca estéril.

Metodologia

1. Processamento inicial do líquor: processar, semear e incubar as amostras;
2. Reportar a aparência do líquor: se claro, hemorrágico, turvo, xantocrômico e o volume:
    - Se o volume do líquor for <1 mL:
      Homogeneizar e realizar semeadura e o Gram diretamente do material.
    - Se o volume do líquor for >1 mL:
        - Centrifugar por 10 min a 3000 rpm;
        - Deixar a centrífuga parar espontaneamente, sem usar o freio;
        - Verter o sobrenadante em um tubo estéril;
        - Homogeneizar o sedimento vigorosamente até ressuspendê-lo. Se necessário, usar o agitador para misturar o sedimento, pois as bactérias e as células podem aderir a parede do tubo e causar resultados falsos negativos (este passo é crítico para a qualidade do resultado);
        - Inocular o sedimento nas placas de meio e no caldo;
        - Com uma pipeta de 150 µL retirar o sedimento e processar na citocentrífuga - Preparar amostras biológicas em centrífuga citológica.
        - Deixar secar a temperatura ambiente;
        - Alternativamente, deixar a lâmina secar em uma superfície aquecida;
        - Fixar a lâmina com metanol e corar para Gram.

Questões para Estudo

1. Qual a característica morfotintorial da *Neisseria meningitidis*?
2. Como deve ser realizada a coleta do LCR?

Referências

Brasil. Ministério da Saúde. Biossegurança em saúde: prioridades e estratégias de ação / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 242 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BROOKS, G.F. et al. **Microbiologia Médica:** de JAWETZ, MELNICK e ADELBERG. 25a Ed. Editora AMGH, 2012.

FILHO, H. M. T. Gastroenterites Infecciosas. JBM. Março/Abril, 2013. vol. 101, n. 2.

LEITE, A. A. et al. Análise do liquido cefalorraquidiano. revisão de literatura. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 4, n. 3, p. 1–24, 2016.

LEVY, C. E. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. **Manual de Microbiologia Comemorativa do IX congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar**, v. unico, p. 01–381, 2004.

MADIGAN, M.T. et al. Microbiologia de Brock. 12a Ed. Editora ArtMed, 2010.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S; MICHAEL, A.P. Microbiologia Médica. 6a Ed. Editora Elsevier, 2009.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 10a Ed. Editora ArtMed, 2012.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. Microbiologia. 5a Ed. Editora Atheneu, 2008.

ZOCHIO, L. B. Biossegurança em Laboratórios de Análises Clínicas. Academia de Ciência e Tecnologia. São José do Rio Preto, 2009.