

Aula 00 (Prof^a. Ana Cristina)

*FioCruz - Tecnologista em Saúde Pública
(Perfil Controle Microbiológico de
Produtos sujeitos à Vigilância Sanitária -
TE78) Conhecimentos Específicos - 2023*

Autor:
(Pós-Edital)

**Ana Cristina dos Santos Lopes,
André Rocha**

03 de Janeiro de 2024

Sumário

Microbiologia - Parte I	2
1 - Considerações Iniciais.....	2
2 - Introdução à Microbiologia.....	3
2.1 - Microrganismos	3
2.2 - Procedimentos Laboratoriais	3
3 - Meios de Cultura e Provas de Identificação	15
4 - Semeadura dos diversos materiais biológicos destinados à cultura	43
5 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	47
6 - Diagnóstico de infecções.....	50
6.1 - Infecções do Trato Urinário	50
6.2 - Infecções da Pele e Tecido Subcutâneo	52
6.3 - Infecções Intestinais.....	55
6.4 - Infecções do Sistema Nervoso Central	56
7 - Controle da infecção hospitalar	58
8 - Microbiologia da água e dos alimentos	65
9 - Considerações Finais	74
Lista de Questões	75
Questões Comentadas	89
Gabarito	113
Referências	114



MICROBIOLOGIA - PARTE I

1 - Considerações Iniciais

Olá, alunos!

Hoje vamos começar o estudo de **Microbiologia**. Para fins didáticos, essa disciplina geralmente é dividida em 3 partes: **bacteriologia**, **micologia** e **virologia**. Vamos estudar estes assuntos bem a fundo, dando ênfase em tópicos como meios de cultura, coloração de Gram e identificação bacteriana.

Dentro da Microbiologia, a maioria das questões cobra **identificação bacteriana**, exigindo que o candidato saiba as características de cada grupo de bactérias. Assuntos como **coloração de Gram** e **meios de cultura** também são cobrados de forma recorrente.

Os tópicos de micologia (fungos) e virologia são cobrados com menos frequência, mas não podem ser negligenciados. Ter domínio de tópicos menos cobrados pode ser o seu diferencial em comparação com outros candidatos. Então vamos tentar ser bem abrangentes, para que sua preparação seja completa e você chegue na sua prova bem-preparado.

Vamos juntos iniciar mais uma aula?



Bons estudos!

2 - Introdução à Microbiologia

2.1 - Microrganismos

Microrganismos são organismos **microscópicos**, ou seja, que não podem ser visualizados a olho nu. Dentro da microbiologia, os microrganismos mais estudados são as **bactérias**, os **fungos** e os **vírus**. O corpo humano é colonizado por vários microrganismos, o que chamamos de **microbiota residente**. Trata-se de microrganismos que vivem em tecidos ou fluidos do corpo sem causar mal para o hospedeiro, sendo que alguns são até benéficos (como as bactérias intestinais que auxiliam no processo de digestão de alguns nutrientes). Contudo, o foco do estudo da microbiologia clínica são os **microrganismos patogênicos**, aqueles capazes de causar algum tipo de doença.

Nos tópicos a seguir estudaremos os principais procedimentos adotados em laboratórios em busca do diagnóstico microbiológico.

2.2 - Procedimentos Laboratoriais

2.2.1 - Coleta, Transporte e Conservação de Amostra

Dentro de um laboratório de microbiologia, todas as etapas devem ser rigidamente controladas. Por este motivo, é essencial a confecção de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) descrevendo minuciosamente cada tarefa, desde a coleta do material, até a emissão do laudo.

Os principais erros observados são em relação à coleta da amostra (amostra inadequada, utilização de frascos não estéreis), transporte da amostra (meios de transporte inadequados, tempo de transporte acima do estabelecido) e erros analíticos, como uso de meios de cultura não indicados e interpretação errônea dos resultados.

Quando os procedimentos são realizados de forma correta, isso garante a viabilidade do microrganismo de interesse e consequente sucesso nas etapas de inoculação e análise. Porém, a ocorrência de falhas pode não só **inviabilizar o crescimento do microrganismo de interesse**, como pode também **promover a contaminação da amostra**, e consequente crescimento de microrganismos irrelevantes.

Os procedimentos de coleta variam a depender do tipo de amostra que será coletada. Já o transporte deve ser realizado o mais rápido possível. O quadro a seguir ilustra o tempo crítico para a entrega de diferentes amostras ao laboratório de microbiologia, além do tipo de meio de transporte indicado para cada amostra.





Amostra	Tempo crítico	Temperatura	Meio de transporte
Anaeróbios	30 minutos	Ambiente	Fragmento ou aspirado em frasco estéril, meio de transporte semissólido
Fezes	1 hora	Ambiente	Frasco seco estéril
	12 horas	Ambiente	Meio Cary Blair
Fragmentos	30 minutos	Ambiente	Frasco estéril
	8 horas	Ambiente	Meio de transporte
Líquido pleural	Imediatamente	Ambiente	Tubo seco estéril
Líquor	Imediatamente	Ambiente	Tubo seco estéril
Material respiratório	30 minutos	Ambiente	Tubo seco estéril
Sangue	1 hora	Ambiente	Passar para caldo nutriente imediatamente após a coleta
Swab	Até 8 horas	Ambiente	Meio semissólido (Stuart ou Amies)
Urina	1 hora	Ambiente	Frasco seco estéril
	12 horas	Refrigerada	Frasco seco estéril

Fonte: ANVISA

2.2.2 - Microscopia e Coloração

A análise microscópica pode ser realizada com ou sem coloração, sendo que diferentes tipos de coloração estão disponíveis e são indicadas dependendo do tipo de microrganismo que se deseja investigar.

O método direto sem coloração pode ser realizado com salina, hidróxido de potássio, através do exame em campo escuro e com o uso de tinta da China.

A **salina** (soro fisiológico – 0,85% de cloreto de sódio) é utilizada para observação da morfologia bacteriana e para avaliação da motilidade. O método é indicado para pesquisa a fresco de *Trichomonas* em secreções e fungos (leveduriformes ou filamentosos) em vários tipos de amostras.

O **hidróxido de potássio** (KOH) é usado para pesquisa de fungos (leveduriformes e particularmente filamentosos) em amostras contendo muco, restos celulares, unhas, pelos, dentre outros, pois é capaz de dissolver a queratina presente nessas amostras e destacar as estruturas fúngicas.

O **exame em campo escuro** é indicado para observação da motilidade de bactérias que são de difícil observação na microscopia direta com salina, como o *Treponema pallidum* e a *Leptospira sp.* Mas também pode ser utilizado para visualização da motilidade de outras bactérias, como o *Campylobacter sp.*



A **tinta da China** (nanquim) é principalmente indicada para a pesquisa do fungo *Cryptococcus* em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), mas também pode ser utilizada em outros materiais. Este método destaca a cápsula de *Cryptococcus* contra um fundo negro.

Dentre os métodos de coloração, pode-se citar a coloração de Gram (a mais usada e muito cobrada em provas de concursos) e a coloração de Ziehl-Neelsen.

A **coloração de Gram** é amplamente utilizada na identificação preliminar de bactérias, permitindo observar características como tamanho, forma, agrupamento e resposta à coloração (como bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas). A coloração de **Ziehl-Neelsen** é usada na identificação de microrganismos que não respondem bem à coloração de Gram, os chamados microrganismos álcool-ácido resistentes (BAAR), principalmente as micobactérias.

Coloração de Gram

A **coloração de Gram** é uma técnica comum usada para diferenciar dois grandes grupos de bactérias com base em seus diferentes **constituintes da parede celular**. Esse procedimento distingue entre os grupos **Gram-positivo e Gram-negativo**, colorindo esses microrganismos de **vermelho ou violeta**.

Devido a diferenças na espessura de uma camada de **peptidoglicano na membrana celular** entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas (com uma camada mais espessa de peptidoglicano) retêm o corante primário cristal violeta durante o processo de descoloração, enquanto as bactérias Gram-negativas (que possuem uma parede de peptidoglicano mais fina) perdem a coloração do cristal violeta e são coradas pelo contracorante safranina ou fucsina no processo final de coloração. O processo envolve três etapas:

1. As bactérias são coradas com corante **cristal violeta**. Em seguida, uma solução de **lugol (mordente)** é adicionada para formar um complexo entre o cristal violeta e o iodo. Esse complexo é insolúvel em água.
2. Um **descolorante**, como **álcool 95%** ou uma **solução de álcool-acetona**, é adicionado à amostra, e desidrata a camada de peptidoglicano causando o seu encolhimento. O grande complexo de cristal violeta-iodo não é capaz de ultrapassar essa camada de peptidoglicano reforçado e, portanto, fica preso na célula em bactérias Gram-positivas. Por outro lado, a membrana externa das bactérias Gram-negativas é degradada e a camada mais fina de peptidoglicano das células Gram-negativas é incapaz de reter o complexo cristal violeta-iodo e a cor é perdida.
3. Um **contracorante**, como a **safranina** ou **fucsina**, é adicionado à amostra, corando-a de **vermelho**. Como o contracorante é mais leve que o cristal violeta, não interfere na coloração púrpura nas células Gram-positivas. No entanto, as células Gram-negativas descoloridas são coradas de vermelho.

Antes da realização da coloração de Gram em si, deve-se preparar esfregaços em lâminas da amostra que se deseja analisar. Estes esfregaços devem ser então fixados pelo emprego do calor brando (50°C)



ou pela utilização de etanol ou metanol. Somente após o esfregaço estar fixado é que se deve proceder com os procedimentos para coloração de Gram, descritos a seguir.



Procedimento para coloração de Gram

1. Cobrir a área com a solução de cristal-violeta por cerca de um minuto.
2. Decantar o cristal-violeta e lavar suavemente com a própria solução de iodo ou água da torneira. (Obs.: lavagem excessiva nessa etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas).
3. Cobrir a área do esfregaço com a solução de iodo durante cerca de um minuto.
4. Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona (1:1), até que o solvente escorra incolor.
5. Alternar com água corrente (jato fraco). O tempo usualmente utilizado nessa etapa é de cerca de 10 segundos. (Obs.: lavagem excessiva nessa etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas, assim como, a pouca descoloração pode resultar em pouca retirada do cristal violeta, ocasionando uma tonalidade azulada nas bactérias Gram-negativas).
6. Cobrir o esfregaço com a solução de safranina (ou Fucsina básica 0,1% a 0,2%), por cerca de 30 segundos.
7. Lavar com água corrente.
8. Deixar secar ao ar, ou em temperatura branda (50°C) usando secador de cabelos.

Fonte: ANVISA

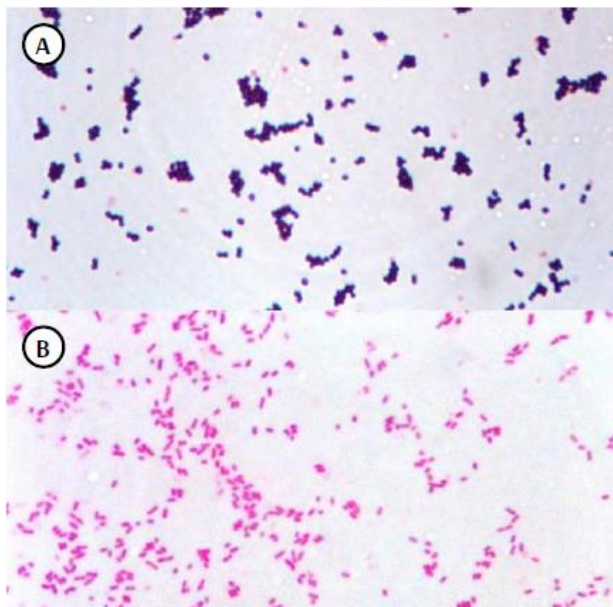
A figura a seguir representa um resumo ilustrado do procedimento de coloração de Gram.





Fonte: adaptado de <http://www.vidriadelaboratorio.com.br/coloracao-de-gram-passo-passo/>

A imagem abaixo ilustra o resultado da coloração de Gram visualizado ao microscópio.



Legenda: Coloração de GRAM. A - cocos Gram-positivos; B - bacilos Gram-negativos. Aumento 1000x.
Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

A tabela abaixo demonstra a correlação entre as principais bactérias de importância clínica e os tipos morfológicos:

Gram-positivos	
Cocos	• Cadeias longas – estreptococos aeróbios e anaeróbios • Cachos – estafilococos e peptococos (anaeróbio). • Cachos e tétrades – <i>Micrococcus</i>, <i>Stomatococcus</i>, <i>Aerococcus spp.</i> • Aos pares – <i>Enterococcus</i>
Coco-bacilo (podem formar cadeias curtas)	• Gram variável – <i>Gardnerella</i> • Em chama de vela – <i>S. pneumoniae</i> • Retos e curtos – <i>Lactobacillus</i>, <i>Erisipelotrix</i>, <i>Listeria</i>, <i>Rhodococcus</i>
Bacilos	• Ramificados – <i>Nocardia</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Actinomyces</i>, • <i>Propionibacterium</i> (anaeróbio) • Difteroides – <i>Corynebacterium</i> • Esporulados – <i>Bacillus</i>, <i>Clostridium</i>

Gram-negativos	
Cocos (visualizados aos pares)	• <i>Neisseria</i>, <i>Moraxella</i>, <i>Branhamella</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Veillonella</i> (anaeróbio).
Coco-bacilo	• <i>Haemophilus</i> (pleomórfico, ora cocobacilo, ora bacilo), <i>Brucella</i>, • <i>Bordetella</i>, <i>Pasteurella</i> e os anaeróbios <i>Actinobacillus</i>, <i>Bacteroides</i>. • Curvos – <i>Campylobacter</i>, <i>Helicobacter</i>, <i>Vibrio</i>, <i>Mobiluncus</i> • Helicoidais – <i>Arcobacter</i> e <i>Borrelia</i>. <i>Leptospira</i> e <i>Treponema</i> (não visíveis ao Gram) • Retos – Enterobactérias, não fermentadores • Extremidades afiladas – <i>Fusobacterium</i> (anaeróbio)
Bacilos	• Extremidade bifurcada – <i>Bifidobacterium</i> (anaeróbio)

Fonte: ANVISA



(FAUEL - Pref. Guarapuava/PR - 2019) Um dos métodos de diagnóstico utilizado para diferenciar as bactérias são as colorações. A coloração de Gram é utilizada para diferenciar as bactérias Gram negativas de Gram positivas. Assinale a alternativa INCORRETA.

- A) Lugol é uma solução mordente.
- B) A Fucsina de Gram ou a Safranina coram bactérias Gram negativas.
- C) O Cristal Violeta cora só bactérias Gram positivas.
- D) O Álcool Cetona é utilizado na terceira etapa da coloração.

Comentários:

Letra A: correta. O lugol é considerado uma solução mordente e tem a finalidade de formar complexos com o corante primário cristal violeta.

Letra B: correta. As bactérias Gram-negativas são evidenciadas pela coloração vermelha conferida pelo contracorante Fucsina de Gram ou a Safranina.

Letra C: INCORRETA. O cristal violeta cora tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas. Contudo, na etapa de descoloração as bactérias Gram-negativas são descoradas. **Este é o nosso gabarito.**



Letra D: correta. Na primeira etapa utiliza-se o corante primário (cristal violeta), na segunda etapa utiliza-se o mordente (lugol), na terceira etapa utiliza-se o descolorante (álcool-acetona) e na quarta e última etapa utiliza-se o contracorante (safrarina ou fucsina).

Coloração de Ziehl-Neelsen

A **parede celular** das **micobactérias** contém **alta concentração de lipídios**, tornando-as cerosas, hidrofóbicas e impermeáveis a colorações de rotina, como a coloração de Gram. Elas também são resistentes ao ácido e ao álcool e são descritas como **Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR)**.

O método de **Ziehl-Neelsen** é uma forma de coloração álcool-ácido resistente usada para corar espécies de ***Mycobacterium***, incluindo *M. tuberculosis*, *M. ulcerans* e *M. leprae* e micobactérias não tuberculosas (MNT). A **baciloscopia** é a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) por microscopia em esfregaços de amostras corados pela técnica de Ziehl-Neelsen.

O mecanismo funciona da seguinte forma: inicialmente, a **carbolfucsina** cora todas as células. Quando se realiza a remoção com ácido-álcool, apenas as bactérias que não são álcool-ácido resistentes são descoradas, pois não possuem uma camada lipídica espessa e cerosa, como as bactérias álcool-ácido resistentes. Quando o contracorante (**azul de metileno**) é aplicado, as bactérias não álcool-ácido resistentes o capturam e tornam-se **azuis** quando vistas ao microscópio. As bactérias álcool-ácido resistentes retêm a carbolfucsina e ficam **vermelhas**.

▪

Segue o passo a passo da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen.



Execução da coloração de Ziehl-Neelsen

Cobrir a superfície da lâmina com a solução de carbolfucsina.

Aquecer a lâmina coberta com o corante, lentamente com auxílio de um bico de Bunsen, até a emissão de vapores, tomando o cuidado para não deixar ferver.

Aquecer com calor baixo ou intermitente por um período de três a cinco minutos.

Deixar a lâmina esfriar.

Lavar a lâmina com água corrente.



Cobrir a lâmina com solução de álcool-ácido a 3% e descorar o esfregaço até que o corante não drene mais da lâmina.

Lavar a lâmina com água corrente e esgotando todo resíduo da mesma.

Cobrir a lâmina com o corante de contraste (azul de metileno), por 20 a 30 segundos.

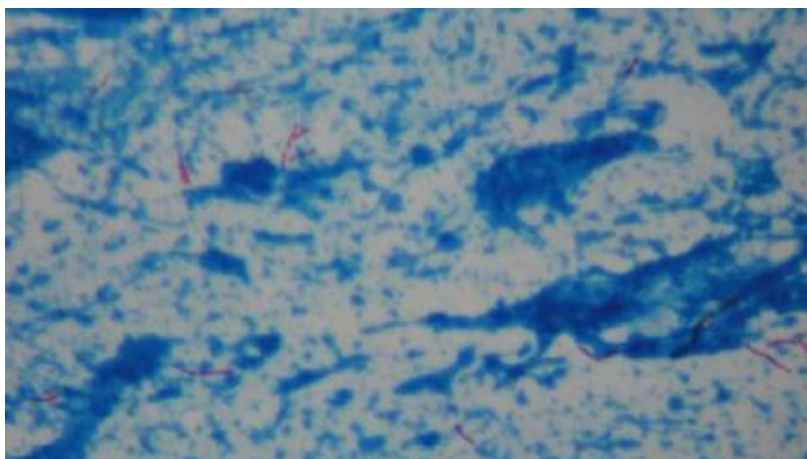
Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar naturalmente sem forçar com papel de filtro.

Examinar o esfregaço com objetiva de imersão no aumento de 100x.

Contar as micobactérias contidas em 100 campos.

Fonte: ANVISA

A figura a seguir ilustra o resultado da coloração de Ziehl-Neelsen para BAAR.



Legenda: A figura mostra campo de uma lâmina de BAAR (+++) na qual é possível identificar vários bacilos álcool-ácido resistentes (em vermelho). A coloração de fundo pelo azul de metileno ajuda na identificação dos bacilos.

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

A **coloração** (principalmente a coloração de Gram) geralmente é o primeiro procedimento de análise microbiológica realizado em uma amostra clínica quando esta chega ao laboratório e permite uma identificação inicial dos tipos de microrganismos. A seguir, as próximas etapas de identificação consistem em **semeadura em meios de cultura** e realização de **provas de identificação**. Veremos todas essas etapas.

2.2.3 - Semeadura em Meios de Cultura

Outro procedimento laboratorial importante na área da microbiologia é a semeadura de amostras em **meios de cultura**, para posterior análise das colônias que se desenvolveram. Meios de cultura diferentes podem ser empregados a depender do tipo de material clínico e do microrganismo que se deseja investigar.

Existem dois procedimentos para semeadura em meios de cultura: a **técnica de semeadura qualitativa** e a **técnica de semeadura quantitativa**. Para o cultivo qualitativo, a semeadura pode ser realizada com o mesmo *swab* do meio de transporte, ou pode-se usar uma alça estéril para captar uma fração do material. Já no cultivo quantitativo, deve-se semear um volume conhecido do material e, após a incubação, realizar a contagem do número de **unidades formadoras de colônia (UFC)**.

A **incubação** deve ser realizada em condições ideais de temperatura, umidade, atmosfera (concentração de O₂ e CO₂) e tempo, sendo que estas condições podem variar a depender do microrganismo que se está cultivando.



São procedimentos gerais para preparação e distribuição de meios de cultura:

1. Usar EPIs para o preparo de meios de cultura (máscaras, jaleco de manga longa e touca).
2. Observar os riscos indicados nos rótulos dos frascos de meios de culturas e de reagentes químicos e fazer uso de EPIs específicos (máscaras, óculos de proteção e luvas).
3. Usar vidrarias limpas, secas e sem trincos ou defeitos. Utilizar vidraria (balão de fundo chato, placa de Petri, tubo de ensaio, frasco, pipeta e outras vidrarias auxiliares) em vidro neutro temperado, termorresistente com parede uniforme e reforçada.
4. Esterilizar a vidraria pelo processo de calor seco (forno Pasteur) 170°C por 120 minutos ou 180°C por 60 minutos.
5. Usar água destilada, deionizada, ou produzida por osmose reversa na preparação de meios de cultura e soluções.
6. Os meios comerciais devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
7. Os meios comerciais e preparados não comerciais devem ser pesados separadamente em papel manteiga e adicionados em uma vidraria adequada, hidratar em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido. Agitar



- firmemente por alguns segundos até obter uma suspensão homogênea. Escorrer o restante da água pela parede para retirar qualquer material aderente.
8. Ajustar o pH dos meios preparados não comerciais com solução de HCl e NaOH 0,1N ou 1N. Nos meios contendo ágar, pesar o ágar separadamente e acrescentar após o ajuste do pH para não obstruir o eletrodo. O pH dos meios comerciais, normalmente, não precisa ser reajustado, mas deve ser verificado a cada lote.
 9. Dissolver os meios líquidos e soluções com agitação e leve aquecimento (não abrir fervura).
 10. Aquecer os meios contendo ágar até ferver com constante agitação. A parede da vidraria deve estar lisa sem pontos de ágar. Caso observe pontos, a fervura não foi suficiente para a total dissolução. Retornar ao fogo para finalizar o procedimento.
 11. Sempre que for necessário o aquecimento dos meios, usar vidro termorresistente tipo Pyrex e aquecer sobre a tela de amianto ou similar e tripé, no bico de Bunsen ou em placa aquecedora.
 12. Usar sempre luvas térmicas apropriadas para laboratório para manipular vidrarias quentes.
 13. Normalmente, quando for usado o termo "esterilizar em autoclave", o tempo de esterilização é de 15 minutos e a temperatura de 121°C. Observar as recomendações contidas no rótulo ou manual do fabricante.
 14. Sempre que for usado o termo "esterilizar por filtração", usar membrana composta por ésteres de celulose ou polímeros plásticos e com porosidade de 0,22µm de diâmetro, recomendado para reter partículas bacterianas. A esterilização por filtração é utilizada quando o material é sensível ao calor, como alguns meios de cultura, soluções de açúcares, soluções de antibióticos e outros.
 15. Quando distribuir o meio antes de autoclavar, os tubos não precisam estar esterilizados.
 16. Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis.
 17. Os meios devem ser autoclavados com as tampas semiabertas, para que a esterilização seja por igual em todo o conteúdo dos tubos. Tampas fechadas não permitem a entrada do vapor.

Fonte: ANVISA



(CESPE - EBSEERH - 2018) Julgue o item que se segue, acerca do preparo de meios de cultura.

Ao ser distribuído o meio de cultura antes da autoclavagem, os tubos, frascos, as placas, pipetas, vidrarias e os materiais auxiliares devem ter sido previamente esterilizados.



Certo

Errado

Comentários:

Quando distribuir o meio **antes de autoclavar**, os tubos **não precisam estar esterilizados**. Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis.

Gabarito: Errado.

(VUNESP - EBSERH - 2020) Considerando a preparação de meios de cultura, pode-se afirmar que

- A) deve ser utilizada água da rede de abastecimento para hidratar os meios.
- B) o pH deve ser ajustado com ácido clorídrico a 5% para permanecer na faixa de $3,0 \pm 0,2$.
- C) a distribuição dos meios, em placa ou tubos, deve ser realizada em fluxo laminar.
- D) a pesagem dos meios de cultura e suplementos deve ser realizada após suas hidratações.
- E) as principais vidrarias utilizadas são o Erlenmeyer e gral ou almofariz com pistilo.

Comentários:

Letra A: errada. Deve-se usar água **destilada, deionizada**, ou produzida por **osmose reversa** na preparação de meios de cultura e soluções.

Letra B: errada. Deve-se ajustar o pH dos meios preparados não comerciais com solução de **HCl** e **NaOH** **0,1N** ou **1N**. O pH dos meios comerciais, normalmente, não precisa ser reajustado, mas deve ser verificado a cada lote.

Letra C: correta. Esta é uma boa prática que resulta em diminuição das chances de contaminação da cultura. **Este é o nosso gabarito.**

Letra D: errada. Os meios de cultura devem ser pesados separadamente em papel manteiga e adicionados em uma vidraria adequada. **Posteriormente**, devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido.

Letra E: errada. As principais vidrarias utilizadas no preparo e distribuição dos meios de cultura são **balão de fundo chato, placa de Petri, tubo de ensaio, frasco** e **pipeta**. As vidrarias devem ser de vidro neutro temperado, termorresistentes com parede uniforme e reforçada.

2.2.4 - Identificação

A identificação dos microrganismos é feita principalmente a partir do seu crescimento em **meios de cultura** e emprego das chamadas **provas de identificação**. Este é o assunto que trataremos no próximo tópico.



3 - Meios de Cultura e Provas de Identificação

Para identificação laboratorial dos microrganismos são utilizados diferentes meios de cultura e provas de identificação. Como os microrganismos se comportam de maneiras diferentes quando submetidos a diferentes situações, é possível determinar qual tipo está presente a partir destas metodologias de identificação.

Vamos falar primeiro sobre os **meios de cultura**, que nada mais são do que **meios preparados com substâncias nutritivas para os microrganismos, permitindo que eles cresçam** neste ambiente. A maioria dos meios de cultura contém uma substância chamada **ágar**, que se assemelha a uma gelatina. Algumas substâncias nutritivas também são acrescentadas ao meio, variando de acordo com as necessidades do tipo de microrganismo que se deseja cultivar.

Os meios de cultura podem ser **classificados quanto à sua consistência** em: meios líquidos, meios semissólidos e meios sólidos.



Meios líquidos: apresentam-se sob a forma de **caldo**, pois não possuem agente solidificante (ágar). Este tipo de meio pode ser contido em vidrarias como tubos de ensaio, balões ou erlenmeyers;

Meios semissólidos: possui uma **consistência intermediária** por possuir uma pequena proporção de agente solidificante (0,5 a 1,0%). Este tipo de meio geralmente é distribuído em tubos de ensaio e empregado na realização de testes de motilidade;

Meios sólidos: a **consistência é mais firme**, o que se deve à maior concentração de agente solidificante no meio (1,5 a 2,0%). Geralmente é distribuído em placas de Petri ou em tubos de ensaio (de forma inclinada). É o tipo de meio mais utilizado para observação e avaliação da morfologia de colônias de microrganismos.

Os meios de cultura também podem ser **classificados quanto à sua função** em: meios de cultura simples, enriquecidos, seletivos, diferenciais (ou indicadores), de transporte e manutenção (ou conservação). Vejamos a seguir a definição e exemplos de cada tipo de meio de cultura.



3.1 - Meios simples

Os meios de cultura simples possuem nutrientes que **permitem o crescimento da maioria dos microrganismos não exigentes**. Esses meios são geralmente usados para o **isolamento primário de microrganismos**. Exemplos de meios simples são: **Água peptonada**, **caldo nutritivo** e **água nutritiva**.

3.2 - Meios enriquecidos

Os meios enriquecidos contêm os **nutrientes necessários para favorecer o crescimento de uma grande variedade de organismos**, incluindo alguns microrganismos **mais exigentes (fastidiosos)**. Eles são comumente usados para promover o crescimento de todos os tipos diferentes de microrganismos presentes na amostra. Este meio pode ser acrescido de substâncias como sangue, soro, gema de ovo, etc. Dentre os meios enriquecidos, pode-se citar:

Ágar sangue: meio rico oferece ótimas condições de crescimento à **maioria dos microrganismos**.

Ágar chocolate: é um meio enriquecido **não seletivo** no qual **cresce a maioria das bactérias aeróbias e facultativas**. Também permite o crescimento de **microrganismos microaerófilos** quando incubado em CO₂. Este meio permite o crescimento de uma vasta gama de microrganismos, incluindo os **exigentes**, como *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella spp.*

O meio recebe este nome porque apresenta **coloração castanho escura parecida com chocolate**. Porém, ele é obtido a partir da **adição de sangue (de cavalo, carneiro ou coelho)** que é "achocolatado" em banho-maria por 15 minutos na temperatura de 80-85°C. Neste processo, ocorre a **lise das hemácias** e consequente liberação de **hemina e hematina**, que são compostos que favorecem o crescimento dos microrganismos exigentes.

Colônias pequenas e médias com pigmento amarelo são sugestivas de *Neisseria spp.*, *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella spp.* Enquanto colônias pequenas e delicadas com pigmento creme claro sugerem *Haemophilus spp.* Na presença de colônias de microrganismos alfa-hemolíticos, é possível observar halos esverdeados.

Meio de Loeffler: usado para o cultivo e isolamento de ***Corynebacterium diphtheriae***.

Caldo Selenito: utilizado no enriquecimento e isolamento das bactérias ***Salmonella spp.* e *Shigella spp.*** em amostras de fezes, urina e alimentos.





(CESPE - EBSERH - 2018) Julgue o item que se segue, acerca do preparo de meios de cultura.

O meio de cultura ágar chocolate é obtido pela adição de sangue de cavalo, carneiro ou de coelho em alta temperatura, fazendo que as hemácias lisem, liberando hemina e hematina, o que dá origem à cor castanho-escura.

Certo

Errado

Comentários:

O ágar chocolate é obtido a partir da adição de sangue (de cavalo, carneiro ou coelho) que é "achocolatado" em banho-maria por 15 minutos na temperatura de 80-85°C. Neste processo, ocorre a lise das hemácias e consequente liberação de hemina e hematina, que são compostos que favorecem o crescimento dos microrganismos exigentes.

Gabarito: Certo.

3.3 - Meios seletivos

O meio seletivo é formulado para **inibir o crescimento de alguns microrganismos enquanto permite o crescimento de outros**. Em outras palavras, esse meio promove a **supressão diferencial do crescimento**. Os meios seletivos podem consistir em reagentes seletivos adicionais, como alta concentração de sal para selecionar organismos halófilos, ou podem ser empregadas condições de crescimento seletivo. Se um microrganismo é resistente a um determinado antibiótico, como ampicilina ou tetraciclina, esse antibiótico pode ser adicionado ao meio para impedir o crescimento de outros organismos que não possuem resistência, e apenas o microrganismo resistente será selecionado. Dentre os meios seletivos, pode-se citar:

Ágar MacConkey (MC): contém sais biliares e cristal violeta, **que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas** (estafilococos e enterococos) e **permitem o crescimento de bactérias Gram-negativas** (enterobactérias e não fermentadores).

Ágar manitol (Meio de Chapman): apresenta **alta concentração de cloreto de sódio** (NaCl 7,5%). É um meio seletivo para bactérias halófilas (capazes de viver em altas concentrações de sal), como espécies do gênero *Staphylococcus*. Ex: *Staphylococcus aureus*.



Meio Sabouraud: possui **pH ácido** (5,6) e **alta concentração de glicose** (3 a 4%). **Favorece o crescimento de fungos e inibe o crescimento de bactérias.** Também pode conter antibióticos (gentamicina, cloranfenicol) para prevenir o crescimento de bactérias contaminantes.

Meio BDA (batata-dextrose-ágar) acidificado: seu **pH** é seletivo para **fungos**.

Ágar Thayer-Martin: contém **antibióticos** (vancomicina, colistina e nistatina). Usado para **selecionar *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae***. A adição de colistina, vancomicina e nistatina inibe crescimento de enterobactérias, bactérias Gram-positivas, fungos e algumas espécies de *Neisserias* saprófitas.

Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) ou ágar Teague: contém **corantes tóxicos para bactérias Gram-positivas**, permitindo apenas o **crescimento de bactérias Gram-negativas**. É um meio seletivo e diferencial para **coliformes**.

Meio Löwenstein Jensen: contém verde de malaquita que **inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas**. Rico em lipídios, por ter ovos em sua composição. É um meio **seletivo para micobactérias**, como a *M. tuberculosis*.

Ágar Hektoen Enteric (HE): seletivo para **bactérias Gram-negativas**, como *Salmonella* e *Shigella*.

Ágar *Salmonella-Shigella* (SS): seletivo para ***Salmonella* e *Shigella***.

Ágar Cetrimide: possui brometo de cetiltrimetilamônio (cetrimida), que inibe o crescimento de várias bactérias, incluindo espécies de *Pseudomonas*, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*. É, portanto, um **meio seletivo para *P. aeruginosa***.



(UNIFESP - 2018) O crescimento de microrganismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para sua identificação. É importante conhecer o potencial de crescimento de cada meio de cultura e adequar ao perfil bacteriano esperado para cada material. Um meio de cultura utilizado em laboratórios de microbiologia é o Ágar Thayer-Martin Chocolate. Qual é principal finalidade deste meio de cultura?

- A) Para isolamento de diferentes microrganismos patogênicos, possibilitando a verificação da formação de hemólise dos *Staphylococcus spp.* e usado principalmente na prova de satelitismo (para identificação presuntiva de *Haemophilus spp.*).
- B) Para análise de água, alimentos e leite como meio para cultivo de coliformes fecais e totais.



- C) Para crescimento e isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, pois contém em sua fórmula antibióticos que inibem o crescimento de *Neisserias* saprófitas e outras bactérias.
- D) Para isolar cocos e bacilos Gram-positivos e verificar a fermentação ou não da lactose.
- E) Para selecionar e isolar espécies de *Proteus* sp e *Bacillus* sp em amostras de fezes, alimentos e água.

Comentários:

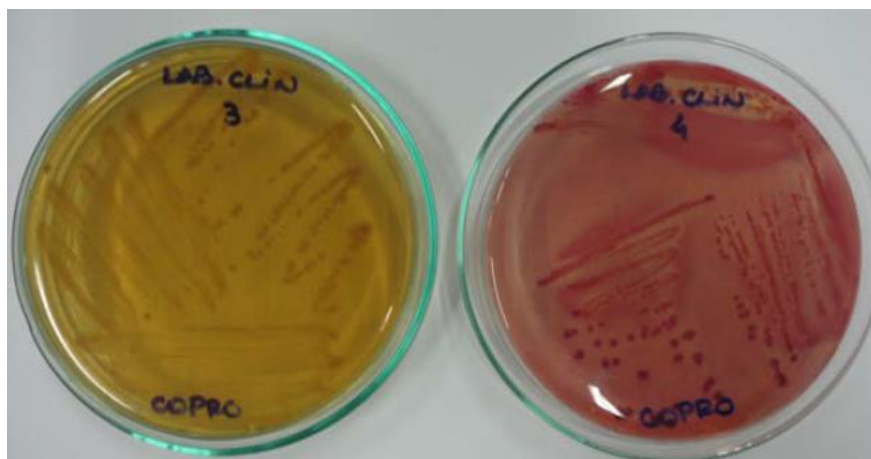
O Ágar Thayer-Martin Chocolate é usado para **selecionar *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae***. A adição de colistina, vancomicina e nistatina inibe crescimento de enterobactérias, bactérias Gram-positivas, fungos e algumas espécies de *Neisserias* saprófitas.

Gabarito: letra C.

3.4 - Meios diferenciais ou indicadores

Meios diferenciais, também chamados de meios indicadores, são utilizados para **distinguir um tipo de microrganismo de outro que cresce no mesmo meio**. Esse tipo de meio utiliza as características bioquímicas de um microrganismo, que cresce na presença de nutrientes ou indicadores específicos adicionados ao meio, para indicar visivelmente as características morfológicas inerentes a um determinado microrganismo (como a cor das colônias). São meios de cultura diferenciais:

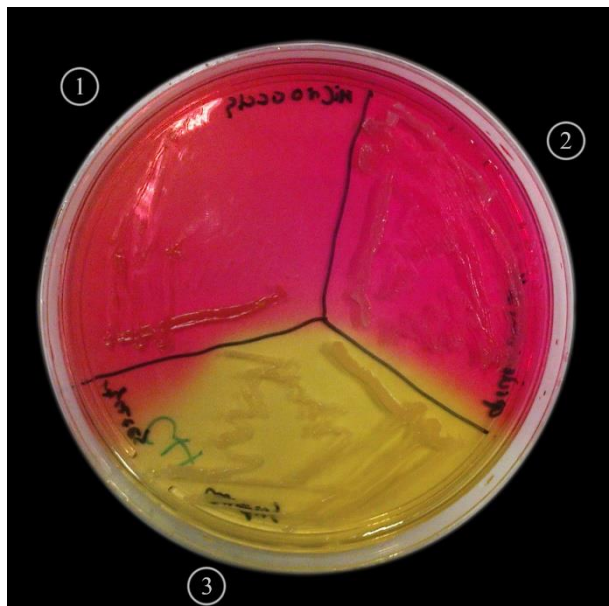
Ágar MacConkey (MC): além de ser um **meio seletivo para bactérias Gram-negativas**, também é um **meio diferencial para a fermentação da lactose** e produção de ácido. As bactérias fermentadoras de lactose acidificam o meio e produzem colônias avermelhadas ou rosadas, enquanto as não fermentadoras de lactose produzem colônias pálidas ou incolores.



Legenda: Placas de MC semeadas com amostras lactose negativa (esquerda) e positiva (direita). A zona turva observada na placa lactose positiva deve-se à precipitação de sais biliares.

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

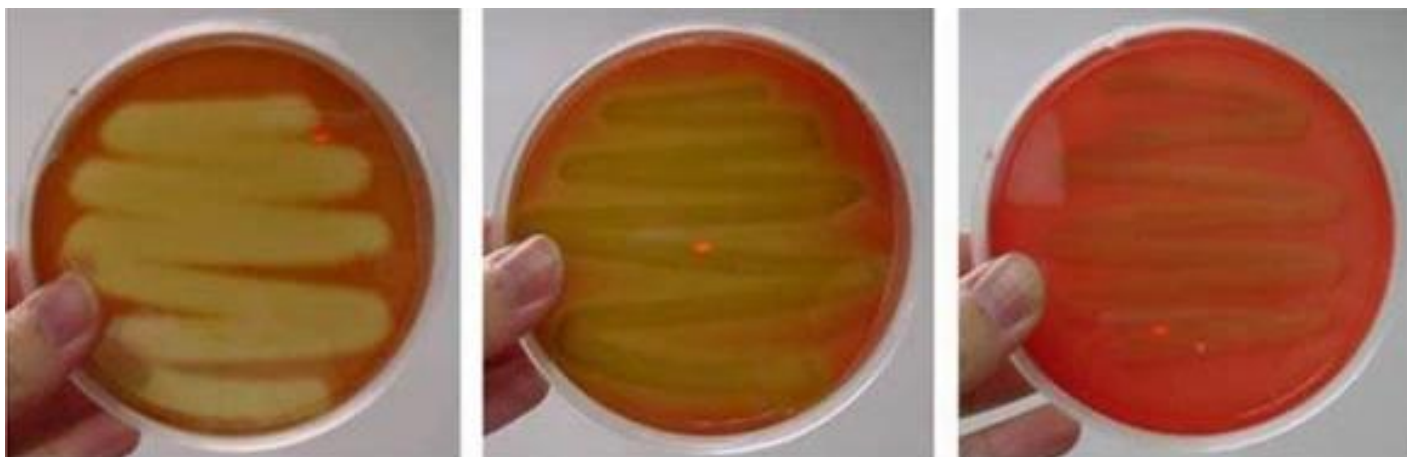
Ágar manitol (Meio de Chapman): além de ser um **meio seletivo pra bactérias halófilas**, também é um **meio diferencial por conter manitol**, um polissacarídeo. As bactérias que fermentam o manitol mudam a cor do meio de vermelho para amarelo. O ***S. aureus* é a única espécie de estafilococos que é capaz de fermentar o manitol.**



Legenda: Placa de cultura de ágar manitol após 24 horas de inoculação, evidenciando o crescimento das seguintes colônias:
1. *Micrococcus* sp.; 2. *S. epidermidis*; 3. *S. aureus*.

Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chapmanes.jpg>

Ágar sangue: contém sangue cardíaco bovino e é usado para identificar microrganismos causadores dos diferentes tipos de hemólise (**hemólise α , β e γ**). O meio, que é originalmente vermelho, forma um **halo transparente** ao redor das colônias de microrganismos **β -hemolíticos**, como *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, evidenciando uma **hemólise completa**. Os microrganismos que causam **alfa-hemólise** (*Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus viridans*) apresentam um **halo esverdeado** ao redor das colônias, o que evidencia a lise parcial de hemácias. E os microrganismos **gama-hemolíticos** (*Enterococcus faecalis*) **não causam hemólise**, logo, não se forma um halo ao redor das colônias. Neste meio cresce a maioria das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de fungos filamentosos (bolors) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros fastidiosos.



Legenda: Placas de cultura de ágar sangue evidenciando hemólise beta (esquerda), alfa (centro) e gama (direita).

Fonte: <https://microbiologyinfo.com/haemolysis-of-streptococci-and-its-types-with-examples/>

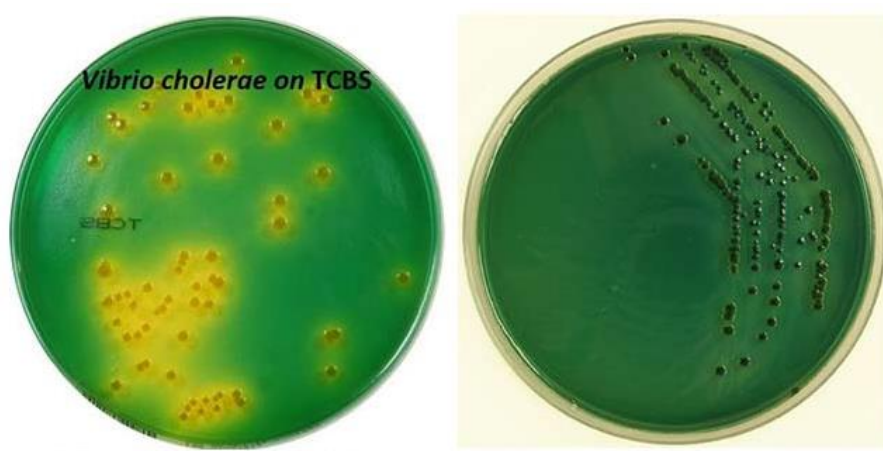
Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB): é um **meio seletivo para coliformes** e **diferencial para a fermentação de lactose**. Microrganismos fermentadores de lactose e produtores de ácido, como a *Escherichia coli*, produzem **colônias escuras com tom esverdeado e brilho metálico**. Microrganismos que são produtores fracos de ácido, como *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, dão origem a colônias acinzentadas. E os microrganismos que não fermentam lactose (e consequentemente não produzem ácido), como *Salmonella* e *Shigella*, formam colônias transparentes.



Legenda: Placa de ágar EMB semeada com *Escherichia coli*. Atentar para o brilho metálico característico.

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

Ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (ágar TCBS): é um **meio diferencial para *Vibrio cholerae***, que produz **colônias amarelas devido à fermentação da sacarose**. Originalmente, o meio é verde. Todas as espécies de *Vibrio spp.* patogênicas, com exceção de *Vibrio hollisae*, crescem no ágar TCBS.



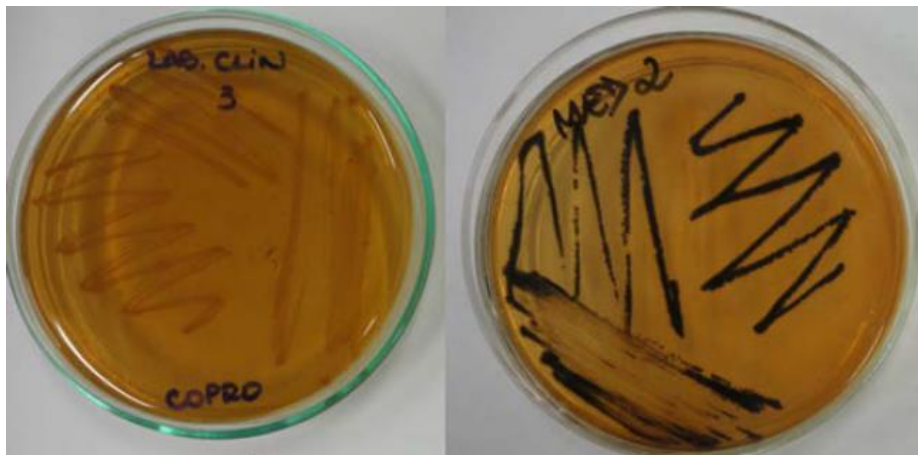
Legenda: Placa de ágar TCBS semeada com *Vibrio cholerae* (esquerda) e *Vibrio parahaemolyticus* (direita).

Fonte: <https://microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>.

Ágar *Salmonella-Shigella* (SS): meio seletivo para *Salmonella* e *Shigella* e diferencial para a **utilização de lactose** (coloração rósea) e **produção de H_2S** (coloração negra).

O ágar SS é um meio originalmente vermelho alaranjado que contém sais de bile, verde brilhante e citrato de sódio, que são componentes que **inibem o crescimento de microrganismos Gram-positivos** (*Staphylococcus* e *Enterococcus*). O meio também contém lactose, cuja fermentação ajuda a diferenciar as colônias em lactose positivas (que produzem ácido na presença de um indicador vermelho neutro e formam colônias cor de rosa) e lactose negativas (colônias transparentes). A presença de tiosulfato de sódio e citrato férrico na composição permite a identificação de **H_2S** , que é evidenciado pela formação de **colônias com centro negro** (*Proteus spp.* e algumas espécies de *Salmonella spp.*).

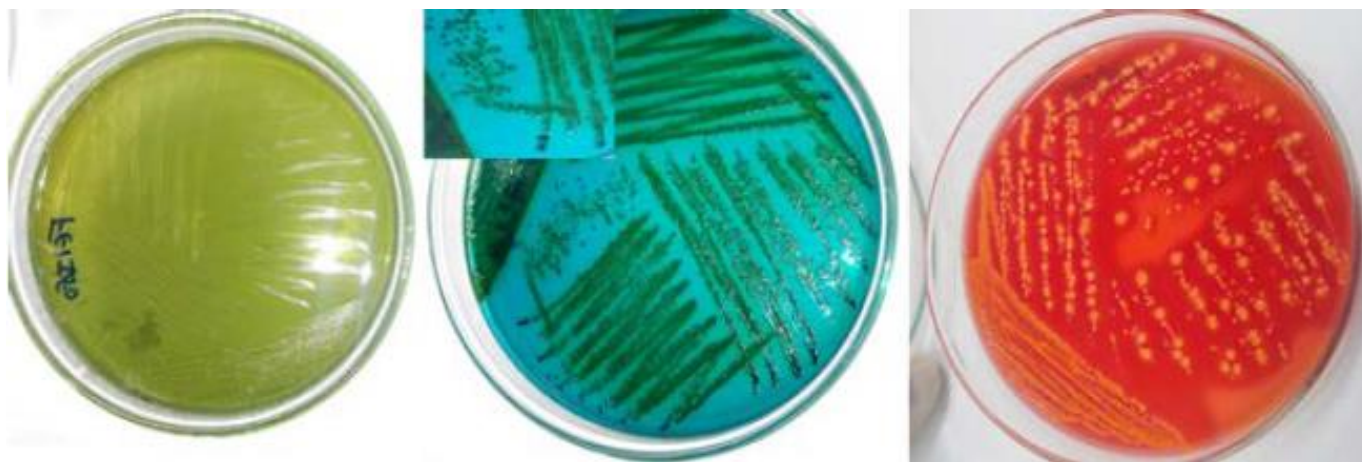
Colônias incolores ou com o centro negro (**sulfeto de hidrogênio - H_2S**) são sugestivas de *Salmonella*. Porém, colônias incolores também podem ser *Shigella spp.* Espécies de *Proteus spp.* produzem colônias com centro negro. Já colônias cor de rosa ou vermelhas são sugestivas de *Escherichia coli* ou *Klebsiella spp.*



Legenda: Placas de SS semeadas com bactéria lactose e H₂S negativos (esquerda) e H₂S positivo (direita). Atentar para a pigmentação escura das colônias.

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

Ágar Hektoen Enteric (HE): meio seletivo para espécies enteropatogênicas de *Salmonella* e *Shigella* e diferencial para a utilização de carboidratos (lactose, sacarose e salicina) e produção de H₂S (coloração negra). Os microrganismos que fermentam os carboidratos presentes no meio dão origem a colônias amareladas, os que não fermentam sacarose formam colônias translúcidas ou verde-claras, já os que não fermentam lactose e sacarose (mas acidificam a salicina) podem formar colônias alaranjadas.

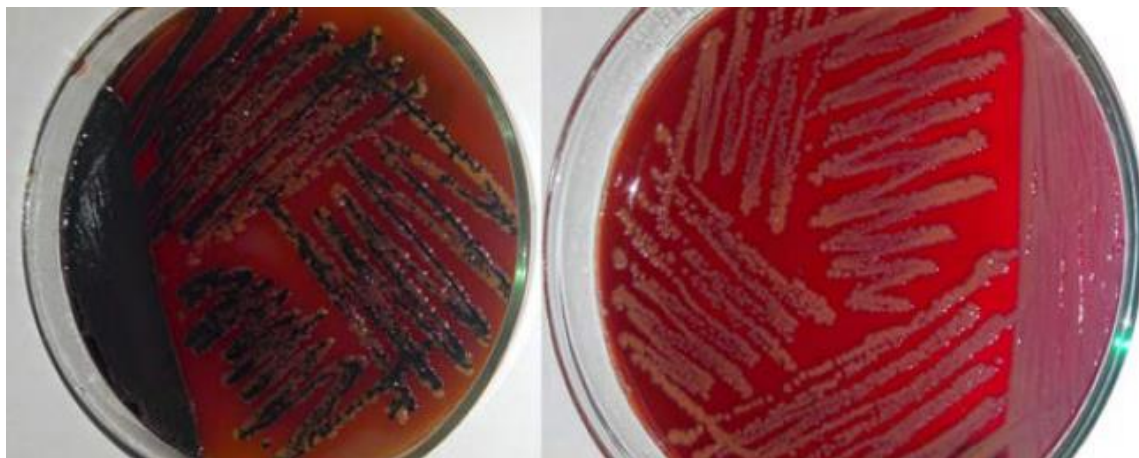


Legenda: Meio ágar Hektoen em sua coloração original (placa da esquerda); HE semeado com cepa de *Salmonella* (placa ao centro). Note a presença de pigmento negro. HE semeado com cepa de coliforme fecal (placa à direita).

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD): meio que contém **lactose, sacarose e xilose**. Os microrganismos que fermentam os carboidratos presentes no meio dão origem a colônias amarelas e os que não fermentam dão origem a colônias incolores. Semelhantemente ao que ocorre no ágar *Salmonella*-

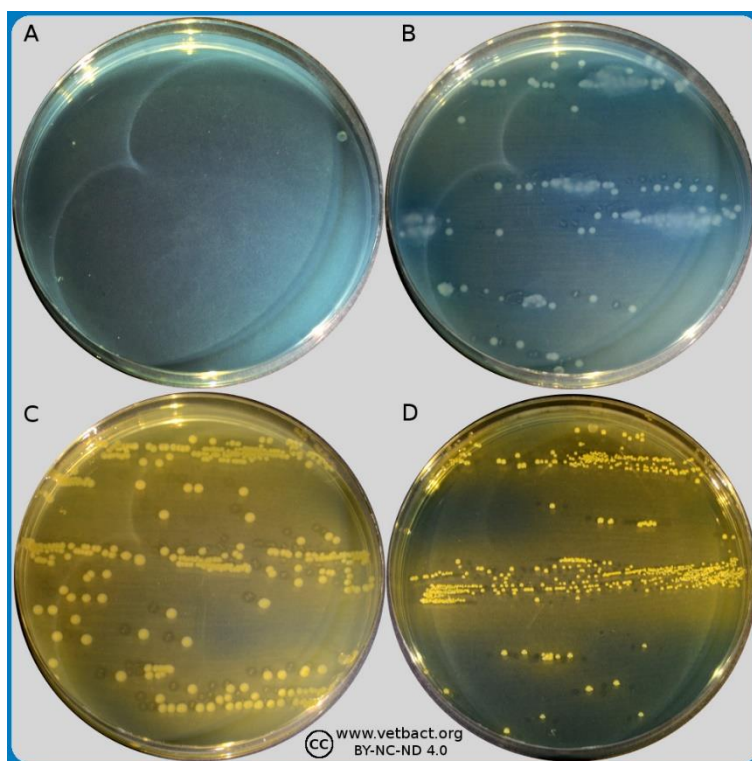
Shigella, microrganismos que produzem H_2S formam um pigmento negro. Colônias negras sem halo cor de rosa são mais características de cepas de *Proteus spp.* produtoras de H_2S .



Legenda: Ágar XLD semeado com cepa produtora de H_2S (à esquerda) e não produtora (à direita).

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.

Ágar CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient): meio originalmente azul claro usado no isolamento e na **quantificação de microrganismos** (Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras) em **amostras de urina**. Por ser deficiente em eletrólitos, **inibe o véu de cepas de *Proteus* e o crescimento de espécies de *Shigella***. Nesse meio, colônias lactose positivas apresentam coloração amarela, enquanto colônias lactose negativas apresentam cor azul.



Legenda: Placas de ágar CLED. A: meio puro, sem cultura; B: *Proteus vulgaris*; C: *Escherichia coli*; D: *Staphylococcus pseudintermedius*.

Fonte: <https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=50>



(UNIFESP - 2018) O Ágar *Salmonella Shigella* é um meio diferencial seletivo empregado em bacteriologia para isolar *Salmonella* e *Shigella* a partir de fezes, por exemplo. Considera-se como princípio de ação desse meio:

- A) As bactérias Gram-negativas são inibidas pela presença de sais biliares, verde brilhante e citrato sódico presentes nomeio.
- B) As bactérias Gram-positivas são estimuladas na presença dos sais biliares e apresentam crescimento de colônias com coloração vermelho brilhante.
- C) O vermelho neutro serve de indicador de pH, sendo que as colônias que fermentam a lactose produzem colônias de coloração amarela.
- D) O vermelho neutro serve de indicador de pH, sendo que *Shigella* e *Salmonella* crescem em colônias rosa.
- E) As cepas de *Proteus* e *Salmonella* produzem H_2S que reage com citrato férrico e tiosulfato de sódio, resultando no sulfato ferroso, que possui coloração preta e, portanto, a colônia cresce com cor preta.

Comentários:

Letra A: errada. As bactérias **Gram-positivas** são inibidas pela presença de sais biliares, verde brilhante e citrato sódico presentes nomeio.

Letra B: errada. O crescimento de bactérias Gram-positivas é **inibido** no ágar *Salmonella-Shigella*.

Letra C: errada. Colônias que produzem ácido no ágar *Salmonella-Shigella* produzem **colônias cor de rosa**.

Letra D: errada. *Shigella* e *Salmonella* são lactose negativas, ou seja, produzem **colônias transparentes**. Colônias cor de rosa ou vermelhas são sugestivas de *Escherichia coli* ou *Klebsiella spp*.

Letra E: correta. Colônias com o centro negro são sugestivas de microrganismos que produzem H_2S (*Proteus* e *Salmonella*). **Este é o nosso gabarito.**

(FAFIPA - Prefeitura de Arapongas - PR - 2020) Os meios de cultura utilizados nos laboratórios de análises clínicas são meios destinados para reprodução, isolamento e análise de microrganismos de interesse médico. A composição química e outras substâncias contidas no meio de cultura é quem provém condições necessárias para que os microrganismos inoculados multipliquem-se e se consiga isolá-los e identificá-los. A respeito deste assunto, assinale a alternativa CORRETA:



A) Agar SS possui componentes para inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas. É meio seletivo para diferenciação de *Salmonella* e *Shigella*. A *Shigella* em Agar SS forma colônias pretas, enquanto a *Salmonella* em meio Agar SS forma colônias transparentes por não fermentar carboidratos presentes neste meio de cultura.

B) O Agar MacConkey é meio seletivo para bactérias Gram-negativas e diferencial para bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose. As bactérias fermentadoras de lactose tornam o meio amarelo claro e as bactérias não fermentadoras de lactose tornam o meio rosa choque.

C) O Agar sangue é amplamente utilizado para o cultivo e seletividade de bactérias exigentes, é feito à base de sangue de cavalo ou coelho em temperaturas altas (56°C), contém glóbulos vermelhos lisados, para a liberação de hemina e hematina, dando a característica de coloração marrom ao Agar.

D) O meio de cultura Agar Sal Manitol é utilizado para isolamento de estafilococos patogênicos, onde favorece o crescimento da *E. coli* e inibe as colônias de *Staphylococcus*.

E) O meio de cultura Eosina Azul de Metileno (EBM) é utilizado para diferenciar bactérias Gram-negativas. Os coliformes produzem colônias pretas-azuladas e a *E. coli* fermenta rapidamente a lactose, formando colônias verde metalizadas.

Comentários:

Letra A: errada. O **Ágar *Salmonella-Shigella* (SS)** possui componentes para inibir o crescimento de bactérias **Gram-positivas**. É um meio seletivo para ***Salmonella* e *Shigella*** e diferencial para a utilização de lactose (coloração rósea) e **produção de H_2S** (coloração negra). Neste meio, colônias incolores ou com o centro negro (**sulfeto de hidrogênio - H_2S**) são sugestivas de *Salmonella*. Porém, colônias incolores também podem ser *Shigella spp.* Espécies de *Proteus spp.* produzem colônias com centro negro. Já colônias cor de rosa ou vermelhas são sugestivas de *Escherichia coli* ou *Klebsiella spp.*

Letra B: errada. O **Ágar MacConkey (MC)** é um meio **seletivo para bactérias Gram-negativas** e **diferencial para a fermentação da lactose** e produção de ácido. As bactérias fermentadoras de lactose acidificam o meio e produzem colônias **avermelhadas ou rosadas**, enquanto as não fermentadoras de lactose produzem colônias **pálidas ou incolores**.

Letra C: errada. O **Ágar sangue** contém sangue cardíaco bovino e é usado para identificar microrganismos causadores dos diferentes tipos de hemólise (**hemólise α , β e γ**). Neste meio cresce a maioria das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de fungos filamentosos (bolors) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros fastidiosos. **A alternativa descreve o Ágar chocolate.**

Letra D: errada. O **Ágar manitol (Meio de Chapman)** é um **meio seletivo para bactérias halófilas** e **diferencial por conter manitol**, um polissacarídeo. As bactérias que fermentam o manitol mudam a cor do meio de vermelho para amarelo. O ***S. aureus* é a única espécie de estafilococos que é capaz de fermentar o manitol.**

Letra E: correta. O **Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB)** é um **meio seletivo para coliformes** e **diferencial para a fermentação de lactose**. Microrganismos fermentadores de lactose e produtores de ácido, como a ***Escherichia coli***, produzem **colônias escuras com tom esverdeado e brilho metálico**. Microrganismos que são produtores fracos de ácido, como *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, dão origem a colônias acinzentadas. E os microrganismos que não fermentam lactose (e consequentemente não produzem ácido), como *Salmonella* e *Shigella*, formam colônias transparentes. **Este é o nosso gabarito.**



3.5 - Meios de transporte

As amostras clínicas devem ser transportadas para o laboratório imediatamente após a coleta para evitar o crescimento excessivo de microrganismos ou comensais contaminantes (microbiota residente). Esse transporte é realizado usando os chamados **meios de transporte**. Esses meios **evitam a secagem (dessecação) da amostra, mantêm a relação patógeno/comensal e inibem o crescimento excessivo de bactérias indesejadas**, uma vez que contêm apenas a quantidade necessária de nutrientes para permitir que os organismos sobrevivam. Dessa forma, os meios de transporte são capazes de conservar as características da amostra desde o momento da coleta até a realização do semeio em laboratório. Exemplos de meios de transporte incluem:

Meio Stuart: é um gel de ágar mole não nutritivo que mantém os microrganismos vivos, mas impede a sua multiplicação (devido à carência de uma fonte de nitrogênio). O meio é de cor branca opalescente e é capaz de conservar microrganismos patogênicos como: *Haemophilus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* etc.

Cary Blair: meio branco opalescente derivado do meio Stuart usado para transportar fezes de pacientes com suspeita de cólera. Difere do meio de Stuart pela adição de uma solução salina balanceada de tampão fosfato inorgânico e pela retirada do azul de metileno da fórmula.

Salina tamponada: meio líquido tamponado usado para transportar fezes de pacientes suspeitos de sofrer de disenteria bacilar. A turbidez do meio é um indicativo de crescimento bacteriano.

Ágar nutritivo: meio simples, barato e fácil de preparar. Possui coloração branca opalescente e é usado principalmente na manutenção e conservação de amostras, além de possuir aplicação na análise de alimentos e água.

3.6 - Meios de manutenção ou conservação

Os chamados meios de manutenção (ou meios de conservação), como o nome sugere, são utilizados para manter ou conservar amostras de microrganismos. Nesses meios, o crescimento dos microrganismos é limitado, uma vez que há escassez de nutrientes. Dessa forma, evita-se a formação de compostos tóxicos. Os meios de transporte supracitados também podem ser utilizados como meios de manutenção ou conservação.





(MACHADO DE ASSIS - Pref. Caxias/MA - 2018) Além dos meios de cultura para realização dos exames laboratoriais, existem também os meios de cultura próprios para transporte e conservação do material biológico. Qual o meio de cultura adequado para transportar e conservar o material biológico, antes de sua inoculação para a realização de exames laboratoriais?

- A) Ágar sangue
- B) Cary Blair
- C) Ágar chocolate
- D) Água destilada

Comentários:

Letra A: errada. O ágar sangue é um meio enriquecido, sendo também utilizado como meio diferencial.

Letra B: correta. O meio Cary Blair é utilizado no transporte de material fecal. **Este é o nosso gabarito.**

Letra C: errada. O ágar chocolate é um meio enriquecido.

Letra D: errada. Água destilada não é um meio de cultura.

3.7 - Escolha do meio de cultura

Dependendo do tipo de amostra clínica que deve ser investigada, um ou outro meio de cultura pode ser mais adequado. A tabela a seguir resume as principais recomendações de meios de cultura em relação à amostra que se deseja investigar.

Material clínico	Meio de cultura
CULTURA PARA FUNGOS	Sabouraud e Mycosel
CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS	Lowenstein Jensen
COPROCULTURA	Caldo enriquecedor do tipo Selenito, Tetrationsato, etc.
ESCARRO PARA TUBERCULOSE	Conservado em geladeira ou tratado para descontaminação, antes de semear em Lowenstein Jensen
LAVADO BRÔNQUICO	Ágar Chocolate, ágar Mac Conkey
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)	Semear em Ágar Chocolate + Ágar Sangue. Pesquisa de <i>Cryptococcus</i> : coloração com tinta da China
PONTA DE CATETER	Ágar Sangue



HEMOCULTURAS POSITIVAS	Fazer bacterioscopia (Gram) e semear em Ágar chocolate, Ágar sangue e Ágar MacConkey. Frascos para micobactérias, fazer bacterioscopia (Ziehl).
URINA	Ágar CLED. Pode-se optar por semear em Ágar sangue e Ágar MacConkey.
SECREÇÃO VAGINAL, ENDOCERVICAL, URETRAL E URINA	Exame a fresco de secreção vaginal para pesquisa de <i>Trichomonas</i> . Na cultura para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> é suficiente Ágar chocolate; para melhorar o isolamento, semear material endocervical e uretral, utilizando o meio seletivo de Thayer Martin ou outro meio seletivo similar.

Fonte: ANVISA.

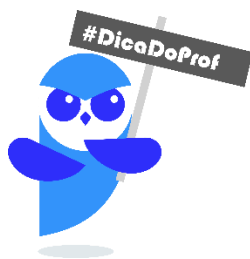


O agente que se deseja investigar também influencia na escolha do meio de cultura, pois alguns meios são seletivos para microrganismos específicos. Vejamos no quadro abaixo:

Agente	Meio específico de acordo com manuais de fabricantes
<i>Bordetella pertussis</i>	Ágar sangue Bordet-Gengou
<i>Brucella spp.</i>	Brucella ágar
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campylobacter ágar
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Ágar cistina-telurito
<i>Legionella spp.</i>	Ágar carvão-extrato de levedura tamponado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ágar Listeria McBride
<i>Mycoplasma/ureaplasma</i>	Transporte: Meio B10 Shepard / Cultura: Meio A7 Shepard
<i>Neisseria</i>	Thayer Martin
<i>Neisseria meningitidis</i>	Thayer Martin
<i>Vibrio spp.</i>	TCBS
Obs: existem meios cromogênicos específicos para diferentes patógenos	<i>Salmonella spp.</i> e <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> O 157. Para algumas espécies de <i>Candida</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , etc.

Fonte: ANVISA.





Sabia que alguns microrganismos apresentam cheiros característicos?

Cheiro de cloro: *Eikenella corrodens*

Perfume ordinário: *Pseudomonas aeruginosa*

Cheiro fétido: Anaeróbios

Caramelo – alguns *Streptococcus viridans*

Fermento – *Candida spp.*

Queijo – *S. aureus*

Terra – *Nocardia* e *Streptomyces*

Peixe – *Acinetobacter* em ágar sangue

Fonte: ANVISA.

3.8 - Provas de Identificação

Para identificar microrganismos (principalmente bactérias), nos baseamos nos resultados de **testes bioquímicos**, as chamadas **provas de identificação**. A forma como cada microrganismo reage aos testes bioquímicos funciona como uma impressão digital para a sua identificação. Isso ocorre porque cada espécie de microrganismo possui uma sequência de DNA única. Como o DNA codifica a síntese proteica, diferentes espécies de microrganismos devem, por meio de seu DNA único, ser capazes de sintetizar diferentes enzimas. As enzimas catalisam várias reações químicas. Portanto, diferentes espécies de microrganismos respondem de forma única a um conjunto de testes bioquímicos.

Veremos neste tópico as provas de identificação mais utilizadas e que mais são cobradas em provas de concurso.



3.8.1 - Meios Comerciais para Provas de Identificação

Algumas provas de identificação são realizadas em meios comerciais para crescimento de microrganismos. As alterações que determinados microrganismos causam nestes meios são a base para interpretação e identificação. A tabela a seguir apresenta as principais características dessas provas.

Meio	Princípio	Utilidade	Interpretação
Base de nitrogênio para leveduras – Yeast Nitrogen Base	Determina a capacidade das leveduras de assimilar carboidratos, utilizando um meio à base de nitrogênio, livre de carboidratos e discos de papel impregnados com carboidratos, nos quais se observa a presença de crescimento ao redor, após um período de incubação.	Identificar as espécies de leveduras através da prova de assimilação de carboidratos.	Cor original do meio: amarelo palha. Positivo: halo de crescimento ligeiramente opaco ao redor dos discos, que significa a assimilação do açúcar pela levedura. Negativo: Ausência de halo de crescimento. O meio permanece inalterado.
Ágar Citrato Simmons	Verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia, alcalinizando o meio.	Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.	Cor original do meio: verde Positivo: cor azul ou crescimento no local do inóculo. Negativo: não há crescimento e a cor permanece inalterada. Se houver crescimento visual na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para azul (alcalino).
Ágar Bile-Esculina	A prova de Bile-Esculina é baseada na capacidade de algumas bactérias hidrolisarem esculina em presença de bílis. A esculina é incorporada em um meio contendo 4% de sais biliares. As bactérias Bile-Esculina POSITIVAS, são capazes de crescer em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina no meio resulta na formação de	Separação dos <i>Streptococcus</i> Bile-Esculina positiva dos Bile-Esculina negativa. Identificação dos <i>Enterococcus spp.</i> , que são Bile-Esculina positiva. Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores e	Cor original do meio: acinzentado. Positivo: Enegrecimento em pelo menos metade ou mais do meio. Negativo: Ausência de enegrecimento ou crescimento de menos da metade do meio após 72 horas de incubação.



	glicose e esculina. A esculina reage com íons férricos (fornecidos pelo composto inorgânico do meio – o citrato férrico), formando um complexo negro.	enterobactérias, usar o meio sem bÍlis (vide prova de esculina).	
Ágar Sangue – CAMP	Consiste na interação da beta-hemólise secretada pelo <i>Staphylococcus aureus</i> com o microrganismo em estudo, que secreta uma proteína, denominada “fator CAMP”, produzindo aumento de hemólise no local da inoculação.	Separação do <i>Streptococcus</i> beta hemolítico presumível do grupo B de Lancefield (<i>S. agalactiae</i>) e da <i>Listeria monocytogenes</i> (CAMP positivos) dos demais <i>Streptococcus</i> beta hemolíticos e espécies de <i>Listeria</i> .	Positivo: Aumento da área de hemólise em forma de flecha no local onde estão mais próximas as duas estrias de crescimento. Negativo: Ausência de aumento da hemólise. Observa-se nitidamente a hemólise do <i>S. aureus</i> e da cepa em estudo, inalteradas.
Caldo Base de Moeller	As descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para formarem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação, origina dióxido de carbono como produto secundário. Emprega-se normalmente três aminoácidos para identificação dos microrganismos: lisina, ornitina e arginina. A base de Moeller é a mais utilizada. Os produtos aminados específicos, são: • Lisina: Cadaverina. • Ornitina: Putrescina. • Arginina: Citrulina. A conversão da arginina em citrulina é uma atividade de diidrolase, e não descarboxilase, na qual o grupo NH ₂ é retirado da arginina como primeira etapa. Em seguida, a citrulina é convertida em ornitina, que sofre descarboxilação para formar putrescina.	Verificar a capacidade de microrganismos usarem enzimas, auxiliando na identificação. Utilizado principalmente para identificações de enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores, estafilococos.	Cor original do meio: púrpura. Positivo: • Tubo controle (sem aminoácido): amarelo e turvo – indica que o microrganismo é viável e o pH do meio abaixou o suficiente para ativar as enzimas descarboxilase. • Tubo com aminoácido: púrpura e turvo – indica a formação de aminas a partir da reação de descarboxilação. Negativo: • Tubos controle e com aminoácido: púrpura.



	A incubação deve ser em anaerobiose e para isso é adicionado 1 mL de óleo mineral estéril após a inoculação. No início da incubação, a glicose contida no meio é fermentada e ocorre viragem de cor púrpura para o amarelo. Quando o aminoácido é descarboxilado, as aminas alcalinas formadas reverterem a cor do meio para púrpura original.		
Ágar DNase	Cepas de alguns microrganismos produzem DNase e endonuclease termoestável. Essas enzimas hidrolisam ácido desoxirribonucléico (DNA) contido no meio de cultura após um período de incubação. Posteriormente esse meio é acidificado com HCl 1N para a revelação da prova.	Prova de identificação que separa os principais microrganismos de importância clínica, entre eles: • DNase positivos: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Serratia spp.</i> e <i>Proteus spp.</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Cryseobacterium meningosepticum</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i>. • DNase negativos: <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>, demais enterobactérias, demais bacilos Gram-negativos não fermentadores.	A) Revelação com HCl 1 N: • Cor original do meio: amarelo claro. • Positivo: Presença nítida de halo claro na parte inferior e em volta da colônia. • Negativo: Ausência de halo claro em volta da colônia. B) Revelação com azul de toluidina O: • Cor original do meio: azul claro • Positivo: Presença de coloração rosa na parte inferior e em volta da colônia. • Negativo: Ausência de cor rosa. O meio permanece com a cor original, azul.
Ágar Esculina	Verifica se a bactéria é capaz de hidrolisar a esculina. A esculetina exige sais de ferro formando precipitado marrom escuro ou preto.	Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores. Para identificação de <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i> , usar o meio com bÍlis, vide prova de Bile-Esculina.	Cor original do meio: palha. Positivo: marrom escuro ou preto. Negativo: inalterado (palha).



Ágar Fenilalanina	Verifica a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação enzimática.	Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias.	Adicionar diretamente o cloreto férrico no tubo inoculado, antes da interpretação do resultado e distribuir o reagente sobre a superfície do meio. Cor original do meio: amarelo palha. Positivo: formação de uma coloração esverdeada na superfície do meio após a adição do cloreto férrico. Negativo: o meio permanece inalterado
CTA – Cystine Trypticase Ágar	CTA é um meio semissólido, recomendado para o estudo de fermentação de carboidratos de microrganismos exigentes.	Usado para diferenciar espécies de <i>Haemophilus spp.</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>Branhamella catarrhalis</i> e <i>Corynebacterium spp.</i>	Cor original do meio: alaranjado. Positivo: cor amarela, indicando acidificação (fermentação) do meio e turvação. Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, alaranjado, e sem turvação.
Caldo Triptona e SIM	Determinam a habilidade do microrganismo de metabolizar o triptofano em indol. Triptofano é um aminoácido que pode ser oxidado por certas bactérias resultando na produção de indol, após a adição de reagentes de Erlich ou Kovacs.	Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, <i>Haemophilus</i> e anaeróbios.	• Motilidade positiva: microrganismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez. • Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido. • H₂S positivo: ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra. • H₂S negativo: linha ao longo da inoculação inalterada. • Indol positivo: aparecerá um anel vermelho.



			• Indol negativo: aparecerá um anel amarelo.
Caldo Malonato	Determina a habilidade do microrganismo de utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinização do meio.	Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.	Cor original do meio: verde. Positivo: azul. Negativo: inalterado (verde).
Caldo Nitrato	Determina a habilidade do microrganismo de reduzir o nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) ou gás nitrogênio (N_2) (denitrificação).	Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, anaeróbios, <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> e <i>Mycobacterium</i> .	Cor original do meio: incolor a palha. Bolhas de gás dentro do tubo de Durham: bactéria reduziu nitrato a gás = denitrificação. Adicionar 5 gotas dos reagentes A e B no meio, sem homogeneizar. Se desenvolver cor vermelho tijolo significa que a bactéria reduziu nitrato a nitrito. Se após a adição dos reagentes A e B o tubo continuar incolor, adicionar uma pitada de pó de zinco no tubo, se desenvolver cor vermelho tijolo significa que a bactéria não reduziu nitrato a nitrito e o nitrato ainda permanece no meio. IMPORTANTE: algumas bactérias não conseguem reduzir nitrato a nitrito e só conseguem reduzir nitrito, como por exemplo, <i>Alcaligenes Faecalis</i> e <i>Oligella Uretralis</i>, havendo a necessidade de utilizar o caldo nitrito para esse fim.
Meio Base Para Oxidação e Fermentação – OF	Verificar a capacidade do microrganismo em utilizar os carboidratos pela via oxidativa ou fermentativa.	Diferenciar bacilos Gram-negativos quanto ao tipo de metabolismo empregado em utilizar carboidratos.	Cor original do meio: verde. Oxidador: tubo aberto – desenvolvimento de cor amarela.



			Tubo fechado – inalterado (verde). Fermentador: tubo aberto e fechado – desenvolvimento de cor amarela. Assacarolítico: tubo aberto e fechado – inalterado (verde).
Ágar TSI – Triplo Açúcar Ferro	Este meio contém três açúcares: 0,1% glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose, vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo). A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo. O ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada. Essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada ou bico, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada profundidade ou fundo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia. Quando se prepara o meio, é importante que o bico e a profundidade tenham o comprimento igual ao redor de 3 cm cada um, de modo que o efeito das duas câmaras seja conservado.	Diferenciar bacilos Gram-negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.	Cor original do meio: vermelho laranja, levemente opalescente. Leitura: entre 18 e 24 horas. • Cor púrpura = alcalino. • Cor amarelo = ácido. Reações ápice/base: • Púrpura/amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos). • Amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares). • Presença de gás (CO₂) = bolhas ou meio fragmentado. • H₂S positivo = presença de precipitado negro.
Ágar Base Ureia (Christensen)	Determinar a habilidade do microrganismo de degradar a ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio.	Bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, <i>Staphylococcus</i> e <i>Haemophilus</i>.	Cor original do meio: amarelo palha. Positivo: alteração do meio para cor de rosa, pink. Negativo: sem alteração de cor do meio.



			A) Diferentes graus de hidrólise da ureia podem ocorrer: • Tubo inteiro cor pink. • Superfície do tubo cor pink, base não muda de cor. • Fracamente positivo: ápice cor pink, restante do tubo não muda de cor. • Positivo rápido: 1 – 6 horas para <i>Proteus spp.</i> • Positivo tardio: 24 horas a 6 dias ou mais tempo de incubação. Ex: algumas cepas de <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Citrobacter</i>, <i>Haemophilus</i>.
--	--	--	---

Fonte: ANVISA.

3.8.2 - Provas de Identificação

As provas de identificação apresentadas no quadro a seguir se baseiam em reações químicas promovidas por diferentes espécies de microrganismos. Elas são amplamente utilizadas em laboratórios de microbiologia e são muito úteis na identificação de microrganismos.

Prova	Princípio	Utilidade	Interpretação
Prova de catalase	A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em água e oxigênio.	Para <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> .	Positivo: Presença imediata de bolhas – a produção de efervescência indica a conversão do H₂O₂ em água e oxigênio gasoso. Negativo: Ausência de bolhas ou efervescência.
Prova de coagulase	Verificar a capacidade de microrganismos reagirem com o plasma e formarem um coágulo, uma vez que a coagulase é uma proteína com atividade similar à protrombina, capaz de	Separar as espécies de <i>Staphylococcus</i> de importância clínica, <i>S. aureus</i> – coagulase positiva, das demais	A) Coagulase conjugada: • Positiva: formação de precipitado branco e aglutinação dos



	converter o fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação de um coágulo visível. Pode ser encontrada em duas formas que possuem diferentes propriedades: coagulase conjugada e coagulase livre. A coagulase conjugada (prova em lâmina) é também conhecida como fator de aglutinação, encontra-se unida à parede celular bacteriana e não está presente em filtrados de cultivos. Quando as células bacterianas são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas, o que causa agrupamento sob a forma de grumos visíveis. A coagulase livre (prova em tubo) é uma substância similar à trombina e está presente em filtrados de cultivos. É secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominada Fator de Reação com a Coagulase – CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos). Quando uma suspensão em plasma do microrganismo produtor de coagulase é preparada em tubo de ensaio, forma-se um coágulo visível após o período de incubação.	espécies – coagulase negativa.	microrganismos da suspensão, após 15 segundos, no círculo que contém o plasma. • Negativa: ausência de aglutinação no círculo que contém o plasma. • Controle sem plasma: deverá ser leitoso e uniforme, sem presença de precipitado ou aglutinação. • A presença de precipitado ou aglutinação torna a prova inespecífica, devendo ser repetida a prova em tubo. B) Coagulase livre: • Positiva: presença de qualquer grau de coágulo. • Negativa: ausência de coágulo.
Prova de gelatinase	Determina a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas (gelatinase) que liquefaz/hidrolisa gelatina.	Identificar e classificar bactérias fermentadoras, não fermentadoras e bacilos Gram-positivos esporulados.	Positivo: emulsão de gelatina (cor verde) na porção submersa do filme torna-se transparente (clara). Negativo: fita permanece verde, emulsão esverdeada permanece na porção submersa do filme.
Prova de Lecitinase	Cepas produtoras de lecitinase produzem zona opaca ao redor do inóculo.	Diferenciação de espécies de <i>Bacillus</i> e <i>Clostridium</i> .	Cor original do meio: amarelo.



			Positivo: formação de halo branco ao redor das colônias. Negativo: ausência de halo, meio fica inalterado.
Prova de oxidase	O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria.	Ajuda a caracterizar espécies de <i>Neisseria</i> e diferenciar não fermentadores (oxidase positivos) de enterobactérias (oxidase negativas). Diferencia algumas bactérias fermentadoras oxidase positivas entre elas <i>Plesiomonas shigelloides</i>, <i>Aeromonas spp.</i> e <i>Vibrio spp.</i>	Cor original: branca ou levemente azulada. Oxidase positiva: produção de cor roxa imediatamente no local da inoculação da bactéria. Oxidase negativa: não há mudança da cor do papel no local da inoculação da bactéria. Não considerar alteração de cor tardia.
Fermentação de carboidratos	A fermentação de carboidratos é amplamente utilizada para a diferenciação de gêneros e identificação de espécies bacterianas. A prova consiste em verificar a capacidade de o microrganismo fermentar ou não um determinado carboidrato, permitindo assim verificar as suas características que podem auxiliar na identificação.	Identificar e separar espécies de <i>Enterococcus spp.</i>, <i>Streptococcus spp.</i> e <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>.	Cor original do meio: púrpura. Positivo: crescimento bacteriano (turvação do meio) com viragem do indicador para amarelo. Negativo: ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, púrpura e sem turvação. Cor original do meio: alaranjado. Positivo: crescimento bacteriano (turvação do meio) com viragem do indicador para amarelo. Negativo: ausência de crescimento. O meio permanece com a cor



			original, alaranjado e sem turvação.
Prova PYR	A prova de hidrólise PYR é um teste enzimático que consiste na hidrólise do substrato L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide por uma enzima bacteriana, a L-pyroglutamyl-aminopeptidase. A hidrólise do substrato libera β -naphthylamide, que é detectada com a adição do reagente, o N,N dimetilaminocinamaldeído, que forma uma base de Schiff, de coloração vermelha.	Teste presuntivo para identificar <i>Streptococcus</i> beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (<i>S. pyogenes</i>) e <i>Enterococcus spp.</i> Identificação de algumas espécies <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa. Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.	Positivo: Desenvolvimento de cor vermelho cereja em 1 minuto (após adicionar o reagente de PYR). Negativo: Sem alteração de cor (permanece amarela ou alaranjada).
Crescimento a 42 E 44°C	Verificar a capacidade de o microrganismo crescer em altas temperaturas.	Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.	Cor original do meio: púrpura. Positivo: presença de turvação e viragem do indicador de cor púrpura para amarelo = crescimento bacteriano. Negativo: ausência de turvação e permanência da cor púrpura = ausência de crescimento bacteriano.
Teste de motilidade	A bactéria é móvel através do seu flagelo. Flagelos ocorrem nos bacilos Gram-negativos, poucas formas de cocos são móveis. A bactéria pode conter um ou muitos flagelos e sua localização varia com a espécie da bactéria e as condições de cultura.	Determinar se o microrganismo é ou não móvel.	• Motilidade positiva: organismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio, causando turbidez. • Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha de inóculo, em volta continua límpido.
Prova de tolerância ao NaCl 6,5%	A tolerância ao NaCl a 6,5% é uma prova utilizada para verificar a capacidade de alguns microrganismos crescerem em presença do sal.	Separa <i>Enterococcus spp.</i> , que são NaCl 6,5 % positivos dos demais	Cor original do meio: amarelo ou púrpura (dependendo do uso



	Meio base utilizado é o BHI caldo, que é um meio nutritivo de uso geral, empregado para o cultivo de muitas bactérias. Esse meio normalmente contém 0,5 % de NaCl e aumenta-se a concentração para 6,5 %, tornando um meio semisseletivo para o desenvolvimento de alguns microrganismos.	<i>Streptococcus spp.</i> , que são NaCl 6,5% negativos. Identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores.	do indicador na composição). Positivo: Crescimento bacteriano (turvação do meio) com ou sem viragem do indicador. Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, púrpura e sem turvação.
--	---	--	---

Fonte: ANVISA.

Vejamos uma questão sobre o tema que acabamos de estudar.



(IBADE - Pref. Ji-Paraná/RO - 2018) Existem bactérias que são capazes de causar a coagulação do plasma. O teste para verificar a capacidade da bactéria de coagulação se chama teste da coagulase. Esse teste é utilizado para distinguir:

- A) *Streptococcus pyogenes* de *Enterococcus faecalis*
- B) *Streptococcus pyogenes* de *Staphylococcus aureus*
- C) *Staphylococcus epidermidis* de *Neisseria meningitidis*
- D) *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus epidermidis*
- E) *Streptococcus pneumoniae* de *Enterococcus faecalis*

Comentários:

Conforme estudamos, o teste da coagulase é utilizado para separar *S. aureus* (que é coagulase positivo), das demais espécies de *Staphylococcus* (que são coagulase negativos).

Gabarito: letra D.

3.8.3 - Discos para Identificação

Alguns antibióticos também podem ser utilizados no auxílio da identificação de microrganismos, visto que alguns destes são naturalmente sensíveis ou resistentes a diferentes antibióticos. Vejamos no quadro a seguir.



Antibiótico	Princípio	Utilidade	Interpretação
Bacitracina	<i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos do grupo A são sensíveis a concentrações baixas de bacitracina.	Identificação presuntiva de <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos do grupo A (<i>S. pyogenes</i>).	Positivo (Sensível): Presença de qualquer halo ao redor do disco. Negativo (Resistente): ausência de halo ao redor do disco.
Novobiocina	Separa espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativas que podem ser sensíveis ou não a Novobiocina.	Separa cepas de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (Novobiocina resistentes) das demais cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativas de importância clínica.	Resistente: Ausência de halo de inibição ou halos ≤ 15 mm. Sensível: Presença de halo de inibição ≥ 16 mm.
Optoquina	Cloridrato de etil-hidroxipreína (optoquina), um derivado da quinina, inibe de forma seletiva o crescimento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em concentrações muito baixas (5 µg/mL ou menores). As células do <i>Streptococcus pneumoniae</i> que rodeiam o disco sofrem lise, devido à variação da tensão superficial, e é produzida uma área de inibição.	Separa <i>Streptococcus pneumoniae</i> dos demais <i>Streptococcus</i> alfa-hemolíticos.	Positivo (Sensível): • Disco de 6 mm: halo de inibição de 14 mm ou mais. • Disco de 10 mm: halo de inibição de 16 mm ou mais. Negativo (Resistente): • Disco de 6 mm: halo de inibição inferior à 14 mm ou ausência de halo. • Disco de 10 mm: halo de inibição inferior à 16 mm ou ausência de halo.

Fonte: ANVISA.



4 - Semeadura dos diversos materiais biológicos destinados à cultura

Vários tipos de amostras biológicas podem ser semeados em meios de cultura visando à identificação do agente etiológico de diversas patologias causadas por microrganismos. Veremos nos tópicos a seguir as amostras mais utilizadas e os procedimentos para realização da cultura para cada um.

4.1 - Hemocultura

Nós já estudamos os procedimentos para a coleta de sangue para a hemocultura na aula em que tratamos sobre amostras de sangue. Se você não se lembra dos procedimentos, aconselho que revise esta aula antes de prosseguir.

É importante ressaltar que a coleta deve ser realizada **antes da administração de antibióticos**. Porém, caso a antibioticoterapia já esteja em curso, deve-se realizar a coleta preferencialmente no **momento anterior à administração da próxima dose da medicação**. Além disso, deve-se realizar a coleta assim que detectado o **início de um episódio febril**, visto que o pico febril é o momento de maior destruição microbiana, o que pode interferir na recuperação de microrganismos viáveis na hemocultura.

Em relação à investigação laboratorial, é recomendado que se realize a **coloração de Gram** e a semeadura nos meios **ágar chocolate**, **ágar sangue** e **ágar MacConkey**. Caso tenha sido colhido um frasco para micobactérias, deve-se realizar também a **coloração de Ziehl-Neelsen**.

4.2 - Urinocultura

A amostra de urina para realização de **urocultura** (ou **urinocultura**) deve ser coletada observando-se todos os cuidados de higiene, para minimizar a ocorrência de contaminação. Os procedimentos para coleta de urina estão detalhados na aula de urinálise, assim como as orientações para transporte e conservação da amostra. Se necessário, revise este conteúdo.

As amostras de urina devem ser semeadas com o auxílio de uma **alça calibrada de 10 µL** em **ágar CLED**, podendo também utilizar **ágar MacConkey** e **ágar sangue**. Se a contagem for muito elevada, ou em casos de suspeita de infecção mista, pode-se utilizar a alça de 1 µL.

Caso haja uma solicitação de bacterioscopia, deve-se proceder com a confecção de uma lâmina seguida pela **coloração de Gram** e análise ao microscópio. E em casos de investigação de **tuberculose**, a primeira urina da manhã deve passar por um processo de **descontaminação** antes de ser semeada.



4.3 - Coprocultura

Para a realização de **coprocultura**, a amostra de fezes deve ser colhida no início da fase aguda da doença e preferencialmente antes de se iniciar a antibioticoterapia. O transporte das fezes deve ser realizado em **meio de transporte Cary Blair** ou **salina glicerinada tamponada**. Caso não seja possível entregar a amostra no laboratório em até **uma hora**, esta deve ser conservada sobre **refrigeração** (a 4°C) por no máximo **12 horas**. Também é possível realizar a coleta através de um **swab retal**.

A amostra de fezes pode ser semeada em caldo enriquecedor do tipo **Selenito**, **Tetrationato**, etc.

4.4 - Cultura de Secreções

Vários tipos de secreções podem ser utilizados para investigação microbiológica, tais como: secreção **traqueal**, de **orofaringe**, de **ouvido**, **ocular**, de material **urogenital** (uretral, cervical, vaginal), **anal**, entre outros. A coleta de secreções geralmente é realizada por profissionais treinados, para evitar intercorrências e garantir a qualidade da amostra.

Amostras destinadas à investigação de **micobactérias**, como escarro, urina, aspirado gástrico, lavado bronquio-alveolar e fezes, devem ser conservadas em geladeira ou descontaminadas antes de se proceder com a semeadura, que deve ser realizada em **meio Lowenstein Jensen**.

Para pesquisa de **Trichomonas**, a **secreção vaginal** deve ser examinada a **fresco** e a **urina** deve ser **centrifugada**. Se for realizada pesquisa para **Neisseria gonorrhoeae**, pode-se utilizar apenas o **Ágar-Chocolate**; e se for necessário melhorar o isolamento, pode-se semear material uretral e endocervical em um meio seletivo como o **Thayer Martin**.

A amostra de **secreção prostática** é um caso especial, uma vez que, além de o material ser **escasso**, ainda ocorre a **contaminação uretral**. Por este motivo, este material deve ser semeado o mais **rápido** possível após a coleta, utilizando-se uma **alça calibrada 10 µL**. O resultado deve ser relatado em UFC/ mL (multiplicando por 100 o número de colônias significativas do mesmo microrganismo), assim como nas uroculturas.

Alguns materiais que também são escassos são colhidos com **swab** em meio de transporte, como material de vesículas, **swab** de córnea ou conjuntiva, uretral, dentre outros. Nesses casos, o próprio **swab** pode ser diretamente semeado no meio de cultura. Alternativamente, pode-se tentar concentrar este material colocando o **swab** em tubo estéril com 0,5 mL de salina estéril, seguido de centrifugação e separação do sedimento.





Segue orientações para **coleta de secreção de orofaringe**:

- Solicitar ao paciente que abra bem a boca.
- Raspar a mucosa com *swab* sobre as amígdalas e faringe posterior, usando abaixador de língua.
- Evitar tocar na língua e na mucosa bucal.
- Procurar o material nas áreas com hiperemia próximas aos pontos de supuração ou remover o pus ou a placa, coletando o material abaixo da placa.
- Coletar a amostra exatamente na área inflamada, evitando outros sítios na cavidade oral.
- Coletar dois *swabs*, um para confecção imediata da lâmina de bacterioscopia e outro para o cultivo, transportado em meio de transporte adequado (Stuart).

Fonte: EBSEH. POP: Procedimento de coleta de material para cultura.

Segue instruções para **coleta de material urogenital**:

1. Secreção vaginal:

- Higienização da genitália externa com água e sabão neutro.
- Inserir um espéculo (sem lubrificante, usar somente água morna) na vagina.
- Retirar o excesso de muco cervical com *swab* de algodão.
- Inserir os *swabs* indicados, rodar por alguns segundos sobre o fundo do saco, retirar e voltar aos meios indicados: meio de Stuart para bactérias e fungos. Utilizar o caldo ToddHewit para pesquisa de *S. agalactiae* de amostra do intróito vaginal.
- *Swab* seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.



2. Secreção endocervical:

- Inserir um espéculo na vagina e retirar o excesso de muco cervical com *swab* de algodão.
- Inserir os *swabs* indicados no canal endocervical até a ponta do *swab* não ser mais visível.
- Rodar por alguns segundos, retirar evitando o contato com a parede vaginal e voltar aos meios indicados:
 - *Mycoplasma/Ureaplasma* - mergulhar o *swab* dentro da solução do tubo fornecido e agitar. Remover o *swab* e identificar o tubo.
 - *Swab* do meio de transporte específico para *Chlamydia trachomatis* - mergulhar o *swab* dentro da solução do tubo fornecido e agitar vigorosamente. Comprimi-lo contra a parede do tubo. Qualquer excesso de muco deve ser retirado da amostra. Remover o *swab* e identificar o tubo.
 - *Swab* para inserir no meio de transporte de Stuart para cultura de *N.gonorrhoeae*.
 - *Swab* seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.

3. Secreção uretral:

- Desprezar as primeiras gotas da secreção.
- Coletar a secreção purulenta, de preferência pela manhã, antes da primeira micção ou há pelo menos duas horas ou mais sem ter urinado.
- Coletar com alça bacteriológica descartável ou *swab* estéril fino.
- Colocar a amostra em meio de transporte (Stuart) e realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.
- Encaminhar imediatamente ao laboratório.
- Em pacientes assintomáticos, deve-se coletar a amostra através de massagem prostática ou com pequeno *swab* inserido alguns centímetros na uretra.

Obs: o sucesso da cultura depende da rapidez na entrega da amostra.

Fonte: EBSEH. POP: Procedimento de coleta de material para cultura.



4.5 - Espermocultura

A **espermocultura** visa à identificação de **microrganismos patogênicos no sêmen**, tais como: *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, espécies de *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* e *Enterococcus*, entre outros. Diferentemente do espermograma, a coleta da amostra para espermocultura não exige abstinência sexual. Caso também haja uma solicitação para exame de urina, esta amostra deve ser colhida primeiro, caso contrário, o paciente deve urinar antes de colher o sêmen.

O isolamento dos microrganismos deve ser realizado em **cultura quantitativa** nos meios **água sangue**, **água chocolate** e **Thayer Martin**. Também é realizada a contagem de leucócitos e eritrócitos nessa amostra, sendo que uma contagem elevada dessas células está associada a processos inflamatórios.

4.6 - Identificação da Microbiologia Oral

A microbiologia oral envolve o estudo da microbiota da cavidade oral e suas interações com o hospedeiro. O ambiente oral favorece o crescimento de microrganismos por ser rico em nutrientes e água e oferecer condições adequadas de temperatura. A microbiota oral adere às gengivas e aos dentes para não ser deslocada pelo tubo digestivo até o estômago, onde seria destruída pelo ácido estomacal.

São exemplos de **bactérias anaeróbicas** que vivem na cavidade oral: *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Treponema* e *Veillonella*. Alguns **fungos** também são comumente encontrados neste ambiente: *Alternaria*, *Aspergillus*, ***Candida***, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Glomus*, *Penicillium*, entre outros.

Os microrganismos orais desempenham um papel importante no desenvolvimento das duas principais doenças dentárias: **cárie dentária** e **doença periodontal**. Além disso, pesquisas encontraram uma correlação entre a saúde bucal precária e a capacidade da microbiota bucal de invadir o corpo e causar doenças **cardíacas** e afetar a **função cognitiva**.

5 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O **teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)**, também chamado de **antibiograma**, como o nome sugere, é uma forma de avaliar a sensibilidade de um microrganismo a determinados antimicrobianos.

Na prática clínica, os antibióticos são prescritos com mais frequência com base em diretrizes gerais e no conhecimento prévio sobre a sensibilidade de microrganismos mais comuns. Por exemplo, infecções do trato urinário (ITUs) não complicadas podem ser tratadas com quinolona de primeira geração, porque



Escherichia coli, que é o patógeno causador mais provável, é sabidamente sensível ao tratamento com quinolona. No entanto, **muitas bactérias são conhecidas por serem resistentes a várias classes de antibióticos**, e o tratamento nesses casos pode não ser tão simples.

Como a suscetibilidade pode variar mesmo dentro de uma espécie (com algumas cepas sendo mais resistentes que outras), o teste de suscetibilidade a antibióticos geralmente é realizado para determinar **qual antibiótico terá mais sucesso no tratamento de uma infecção bacteriana *in vivo***.

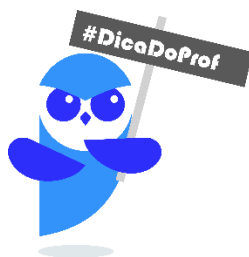
O TSA mais comumente utilizado é o método de **Kirby-Bauer**, que utiliza o princípio da **difusão em disco** e oferece um resultado **qualitativo** ou **semiquantitativo**. No método de Kirby-Bauer, discos de papel pequenos contendo antibióticos diferentes são colocados em uma placa de Petri na qual os microrganismos foram anteriormente inoculados (cerca de 5 minutos antes), sendo o **ágar Müller-Hinton** o meio mais utilizado para este fim. A seguir, deve-se incubar a placa por 18 horas a 35°C em uma estufa bacteriológica. O antibiótico difunde-se na área ao redor de cada disco e um **halo de inibição** (evidenciando lise bacteriana) se formará ao redor do disco se o microrganismo for sensível ao antibiótico. Este halo deve ser medido em milímetros.

Como a concentração do antibiótico é mais alta no centro e mais baixa na borda dessa zona, o diâmetro do halo é sugestivo da **concentração inibitória mínima (CIM)**, que é **inversamente proporcional à medida do halo de inibição**. Contudo, caso seja necessário estabelecer precisamente a CIM de um determinado fármaco em relação ao microrganismo investigado, deve-se proceder com um teste quantitativo (técnicas de microdiluição, macrodiluição, Etest).



Legenda: Leitura do diâmetro do halo de inibição formado após incubação de 18h a 35°C.

Fonte: Holanda et al., 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos.



Os antimicrobianos utilizados no antibiograma devem ser escolhidos segundo recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Cada antibiótico tem um valor de sensibilidade pré-definido.



(COVEST-COPSET - UFPE - 2019) Para determinar a sensibilidade de uma bactéria aos fármacos *in vitro*, utiliza-se o método de difusão em discos. O tamanho da zona de inibição de crescimento bacteriano indica o grau de sensibilidade ao fármaco. Este teste deve ser cuidadosamente padronizado para fornecer resultados confiáveis. Observando os fatores que podem influir nos resultados, analise as proposições a seguir.

- 1) A concentração bacteriana é diretamente proporcional à sensibilidade aparente ao fármaco.
- 2) O diâmetro do halo ao redor do disco está correlacionado com a concentração inibitória mínima do fármaco.
- 3) Os componentes do meio de cultura não interferem no diâmetro do halo de inibição.
- 4) O tempo de incubação das placas em teste é diretamente proporcional à possibilidade de desenvolvimento de bactérias mutantes resistentes.
- 5) A atividade do fármaco pode ser alterada pela temperatura da estufa.

Está(ão) correta(s), apenas:

- A) 5.
- B) 2, 4 e 5
- C) 1, 2 e 4
- D) 1 e 3.
- E) 3.



Comentários:

Vamos analisar cada uma das alternativas:

1) errada: A concentração bacteriana é **INVERSAMENTE** proporcional à sensibilidade aparente ao fármaco. Por este motivo, antes de realizar a inoculação no ágar Müller-Hinton, deve-se diluir o inóculo a uma concentração de 10^8 UFC/ml.

2) correta: A concentração inibitória mínima (CIM) é inversamente proporcional à medida do halo de inibição.

3) errada: Os componentes do meio de cultura podem interferir no diâmetro do halo de inibição.

4) correta: O tempo estabelecido para se realizar a leitura do antibiograma é 18 horas após a incubação. Caso este tempo não seja respeitado, isso pode favorecer o surgimento de bactérias resistentes por mutação.

5) correta: A temperatura da estufa bacteriológica deve ser de 35°C . O não cumprimento desta diretriz pode resultar em interferência na atividade dos antimicrobianos.

Logo, estão corretas apenas as afirmativas 2, 4 e 5.

Gabarito: letra B.

Encerramos aqui o estudo dos métodos utilizados no laboratório de microbiologia. Agora iremos estudar os principais grupos de bactérias de interesse para a saúde humana.

6 - Diagnóstico de infecções

Agora que já estudamos os procedimentos empregados em laboratórios de microbiologia e os principais grupos de bactérias causadoras de doenças em humanos, iremos estudar de forma resumida alguns dos diferentes tipos de infecções que podem acometer o homem, seus agentes etiológicos e métodos diagnósticos.

6.1 - Infecções do Trato Urinário

As infecções do trato urinário (ITUs) podem ser classificadas em altas ou baixas.

As **ITUs altas** são:

- **pielonefrite:** envolvem o parênquima renal;
- **ureterites:** envolvem os ureteres.

As **ITUs baixas** são:



- **cistite**: envolvem a bexiga;
- **uretrite**: envolvem a uretra;
- **prostatite**: envolvem a próstata;
- **epididimite**: envolvem o epidídimo.

O quadro a seguir apresenta as manifestações clínicas e microrganismos frequentemente associados com os vários tipos de ITUs.

Tipo de infecção	Manifestação clínica	Microrganismo isolado(a)	Diagnóstico e Contagem de colônias (UFC/mL)
Trato Urinário alto:			
Pielonefrite	Aguda: febre, náusea, calafrios, vômito, dor no flanco Crônica: assintomática	Enterobactérias como <i>E. coli</i> e outros Gram-negativos, <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	$\geq 10^5^*$
Trato Urinário Baixo:			
1) Cistite	Disúria e aumento da frequência urinária	<i>Escherichia coli</i> , Outros Gram-negativos, <i>S. saprophyticus</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	$\geq 10^5^*$
2) Uretrite	Disúria, aumento da frequência urinária, corrimento uretral	<i>Chlamydia trachomatis</i> (a) <i>Mycoplasma hominis</i> (b) <i>Ureaplasma urealyticum</i> (c) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (d) <i>Trichomonas vaginalis</i> (e) <i>Candida albicans</i> e <i>spp.</i> (f)	Urocultura negativa a – Diagnóstico por métodos moleculares b e c – Secreção uretral semeada em meios de cultura específicos. Alguns kits permitem contagem de colônias – significativo $>10^4$ UTC/mL. d – cresce em ACH e TM e – exame direto de urina de primeiro jato. f – Podem crescer no Ágar sangue, CLED ou meio cromogênico.



3) Prostatite	Aguda: febre, calafrios, dor lombar	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i> e outras enterobactérias.	Urocultura ou cultura de secreção prostática
	Crônica: assintomática ou semelhante aos sintomas da aguda	Menos frequente: <i>Enterococcus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i> *	*diagnóstico por métodos moleculares

* A valorização quantitativa depende da clínica e do agente, podendo valores inferiores a 10^5 UFC/mL serem significativos. Os atuais critérios da Academia Americana de Pediatria para crianças entre 2 meses e 2 anos são de 50.000 U.F.C./mL.

Fonte: ANVISA

Em relação ao diagnóstico das ITUs, o padrão-ouro é a **urocultura**. Outros procedimentos também podem ser empregados, como a pesquisa de **leucocitúria** e **hematúria** (por análise microscópica ou testes químicos) e **bacterioscopia de urina** (com coloração de Gram).

6.2 - Infecções da Pele e Tecido Subcutâneo

As infecções da pele e do tecido subcutâneo são causadas por uma grande variedade de microrganismos e podem se manifestar de diversas formas.

O quadro a seguir traz os agentes etiológicos e métodos de diagnóstico das **lesões eritematosas superficiais**.

Doenças e Síndromes	Agente etiológico mais frequente	Diagnóstico Laboratorial
Impetigo	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue ou Ágar Chocolate
Erisipela	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A), eventualmente outros sorogrupos (G, C ou B) <i>S. aureus</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue, Ágar chocolate, Caldo trypticase soja
Celulite	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> Menos frequentes: Enterobactérias, <i>Pasteurella spp.</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Erysipelotrix spp.</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue, Ágar Chocolate, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato, Caldo trypticase soja.
Foliculite, Furúnculos	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue



Paroníquia	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida spp.</i>	Gram, Cultura em Ágar em Sangue
Micoses superficiais	<i>Candida spp.</i> , <i>Epidermophyton spp.</i> , <i>Microsporum spp.</i>	KOH 10%, Ágar Sabouraud, Dextrose + cloranfenicol e cicloheximida

Fonte: ANVISA

O quadro a seguir traz os agentes etiológicos e métodos de diagnóstico de **ulcerações e nódulos**.

Doenças e Síndromes	Agente etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Lesões esporotricoides	<i>Sporotrix schenckii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i>	Gram, Ziehl, PAS, Gomori Metenamina, cultura de biópsia para micobactérias, Ágar Sangue (selado com parafilme durante 4 semanas), Sabouraud dextrose com cloranfenicol e cicloheximida.
Blastomicose, Criptococose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	Cultura em Ágar Sangue, Sabouraud, dextrose + cloranfenicol + cicloheximida, Tinta da china e/ou calcofluor para <i>C. neoformans</i> .
Difteria cutânea	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Coloração de Gram/ Albert Layburn, Meios de Loeffler e Ágar cistina-telurito
Antraz	<i>Bacillus anthracis</i>	Cultura em Ágar Sangue e Ágar Sangue telurito

Fonte: ANVISA

O quadro a seguir traz os agentes etiológicos e métodos de diagnóstico de **fístulas**.

Doenças e Síndromes	Agente etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Actinomicose	<i>Actinomyces spp.</i>	Gram, cultura em anaerobiose à 37°C, em Ágar Sangue e em caldo por 1-2 semanas.
Maduromicose, Maduromicose podal	<i>Madurella mycetomatis</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Petriellidium boydii</i>	KOH 10%, cultura em Ágar Sabouraud com e sem cloranfenicol + Cicloheximida.
Tuberculose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ziehl-Neelsen, auramina, cultura em meio de Lowenstein-Jensen, PCR
Infecções mistas ou foco crônico	<i>Staphylococcus aureus</i> , Enterobactérias, <i>Pseudomonas spp.</i>	Gram, cultura do aspirado ou do tecido profundo em ágar-sangue e ágar Mac Conkey

Fonte: ANVISA



O quadro a seguir traz os agentes etiológicos e métodos de diagnóstico de **infecção de feridas cirúrgicas**.

Infecções	Agente etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Infecção pós-operatória simples	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus</i> grupo A, Enterobactérias, Enterococos, <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i>	Gram, Cultura do pus, aspirado ou tecido em ágar Sangue, ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato empregando cultura em aerobiose e meio seletivo para anaeróbios em ambiente de anaerobiose estrita.
Infecção de feridas complicadas	<i>Streptococcus</i> grupo A, <i>Staphylococcus aureus</i> , Enterobactérias, <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , cocos anaeróbios, cocos microaerófilos, <i>Fusobacterium spp.</i>	Gram, Cultura em aerobiose, em jarra de anaerobiose e microaerofilia (método da vela) do pus ou tecido. Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato, Ágar enriquecido e seletivo para anaeróbios estritos.

Fonte: ANVISA

O quadro a seguir traz os agentes etiológicos e métodos de diagnóstico de **infecções complicadas**.

Quadro clínico	Agente etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Fasciite Necrotizante	<i>S. pyogenes</i> ou anaeróbios associados a bactérias facultativas	Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato.
Gangrena de Fournier	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , anaeróbios estritos, etc.	Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato.

Fonte: ANVISA

O quadro a seguir traz os agentes etiológicos e métodos de diagnóstico de **lesões causadas por mordeduras**.

Mordeduras	Agente etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Mordedura de animais	<i>Pasteurella multocida</i> (cão e gato), <i>Streptobacillus moniliformis</i> (rato), Anaeróbios, <i>Capnocytophaga spp.</i> (cão), <i>Staphylococcus aureus</i> (cão e gato)	Gram, Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Hemocultura
Mordedura e arranhadura de gatos	<i>Bartonella henselae/quintana</i>	Histologia, cultura em ágar sangue com 5-10% CO ₂ . PCR
Mordeduras humanas	<i>Streptococcus viridans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Capnocytophaga</i> , Anaeróbios estritos, etc.	Gram, cultura de aeróbios em Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Ágar chocolate e cultura em anaerobiose em



meio enriquecido e seletivo para anaeróbios.

Fonte: ANVISA

6.3 - Infecções Intestinais

Os principais agentes das diarreias infecciosas estão resumidos no quadro a seguir.

Evacuação acompanhada de tenesmo, sangue, muco e dor	Disenteria bacilar: <i>Shigella dysenteriae</i>, <i>Shigella flexneri</i>, <i>Shigella sonnei</i>, <i>Shigella boydii</i>, <i>E. coli</i> (EIEC) Campilobacteriose: <i>Campylobacter jejuni</i> Disenteria amebiana: <i>Entamoeba histolytica</i> Protozoários: <i>Balantidium coli</i>, <i>Giardia lamblia</i> Parasitose: <i>Schistosoma mansoni</i>, <i>Strongyloides stercoralis</i>, <i>Trichinella spiralis</i>, <i>Cyclospora spp.</i>, <i>Microsporidium spp.</i> Vibriose: <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Salmonelose: <i>Salmonella typhimurium</i> e outras Salmoneloses Febre tifoide: <i>Salmonella typhi</i> Febre Entérica: <i>Salmonella choleraesuis</i>, <i>Salmonella paratyphi</i> Yersiniose – <i>Yersinia enterocolitica</i> Proctite gonocócica – <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Proctite Sifilítica – <i>Treponema pallidum</i> Proctite Chlamydial – <i>Chlamydia Trachomatis</i> Proctite Herpética – Herpes simples vírus
	Intoxicação alimentar: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Clostridium perfringens</i>, <i>Clostridium botulinum</i> <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)

Diarreia



E. coli enteropatogênica (EPEC)
E. coli entero-agregativa (EAEC)
E. coli difusamente aderente (DAEC)
Enterocolite necrotizante do recém-nascido, enterocolite pseudomembranosa (*Clostridium difficile*), diverticulite, tiflite ou enterocolite do neutropênico/ imunossuprimido
Helicobacter pylori
Rotavírus
Norovírus (Norwalk vírus)

Fonte: ANVISA

Como se pode perceber, são muitos os patógenos que podem causar infecções intestinais. Dessa forma, o método diagnóstico empregado vai depender da suspeita clínica.

6.4 - Infecções do Sistema Nervoso Central

O **Sistema Nervoso Central (SNC)** é formado por **cérebro** e **medula espinhal**, incluindo também estruturas como as **meninges**, **nervos cranianos e espinhais** e **vasos sanguíneos**.

Os principais processos infecciosos que acometem o SNC são: **meningite** (aguda e crônica), encefalite, mielite, neurite, abscesso cerebral, empiema subdural, abscesso epidural e flebite intracraniana supurativa, além de infecções associadas a procedimentos invasivos e dispositivos implantados no SNC.

A **etiologia** dos processos infecciosos que acometem o SNC pode ser **bacteriana**, **fúngica**, **viral** ou **protozoária**. Estes agentes infecciosos podem alcançar o SNC através de várias vias, sendo a principal delas a **via hematogênica**. Outras vias possíveis são: via direta (trauma e procedimentos invasivos e/ou cirúrgicos); por contiguidade (rinofaringe, mediastino posterior, espaço retroperitoneal, entre outros); ascensão de vírus por nervos periféricos.

6.4.1 - Meningite

A **meningite** é uma das principais infecções do SNC e também é a mais cobrada em concursos públicos.



É um tipo de **inflamação aguda das meninges**, que são membranas que recobrem e protegem o cérebro e a medula espinhal. Os principais sintomas da meningite são dor de cabeça, febre e rigidez no pescoço. Outros sintomas incluem confusão ou consciência alterada, vômito e incapacidade de tolerar ruídos leves ou altos. Crianças geralmente exibem apenas sintomas inespecíficos, como irritabilidade, sonolência ou má alimentação.

Essa inflamação pode ser causada por **bactérias, vírus ou outros microrganismos**. Por se tratar de uma inflamação que ocorre próxima ao cérebro e medula espinhal, a meningite pode ser fatal, sendo, portanto, classificada como uma emergência médica. Uma amostra de LCR, coletada por punção lombar, pode ser usada para diagnosticar ou excluir a meningite.

De com a ANVISA, as principais causas de meningite aguda infecciosa são:

- **Bacteriana:** *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, Enterobactérias, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *M. tuberculosis*;
- Meningite por outros agentes ou não determinada;
- Foco supurativo para-meningeo (abscesso cerebral, sinusite paranasal, empiema subdural, abscesso epidural, etc.);
- **Espiroquetas:** *T. pallidum*, *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme, *Leptospira spp.*);
- Rickettsias;
- **Protozoários:** *Naegleria fowleri*, *Strongiloides stercoralis*;
- **Vírus:** Echovirus e Coxsackievirus, Sarampo, Arbovírus, Herpesvírus, Coriomeningite linfocítica, HIV, Adenovírus, Poliovírus;
- **Fungos:** *Cryptococcus spp.*, *Candida spp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus spp.* e outros fungos filamentosos oportunistas;
- *Pneumocystis carinii* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

Ainda de acordo com a ANVISA, as causas mais frequentes de meningite infecciosa crônica são:

- **Meninges:** tuberculose, criptococose, histoplasmose, candidíase, sífilis, brucelose;
- **Lesões Focais:** actinomicose, blastomicose, cisticercose, aspergilose, nocardiose, esquistossomose, toxoplasmose;
- **Encefalite:** citomegalovírus; enterovírus; sarampo, outras encefalites a vírus.



Dados epidemiológicos e etiologia de processos infecciosos do SNC



As frequências relativas com que as diferentes espécies bacterianas e fungos causam meningite comunitária depende da faixa etária:

- Período neonatal – *S.agalactiae* (Grupo B), *E. coli* (antígeno K1) e *Listeria monocytogenes*;
- < 2 anos – *S.pneumoniae* e *N.meningitidis*;
- 2 a 18 anos – *N.meningitidis*;
- > 18 anos – *S.pneumoniae*.

A *Listeria monocytogenes* é responsável por 8% dos casos gerais, sendo mais frequentes no período neonatal e em indivíduos > 60 anos.

O número de casos de meningite pelo *Haemophilus influenzae* sofreu uma redução de 94% após a introdução da vacina conjugada de polissacarídeo-proteína para esse agente.

Em pacientes imunocomprometidos é alta a frequência de *Cryptococcus neoformans*.

Fonte: ANVISA

O diagnóstico das infecções do SNC pode ser realizado a partir da obtenção e análise de uma amostra de **líquor**. A partir desta amostra, pode-se realizar:

- análise microscópica de **esfregaços** corados por Gram, Ziehl-Neelsen e tinta da China;
- **cultura** em ágar chocolate e ágar sangue;
- exame **citológico** (análise de leucócitos);
- testes **bioquímicos** (glicose, proteínas, lactato, LDH);
- testes **sorológicos** para pesquisa de antígenos;
- testes de **biologia molecular** (PCR).

7 - Controle da infecção hospitalar

Sabemos que os ambientes hospitalares recebem todos os dias muitas pessoas com doenças variadas e que muitos dos pacientes que estão nestes locais apresentam quadros de infecções causadas por diversos tipos de microrganismos, tais como bactérias, vírus e fungos. Por este motivo os hospitais, assim como os demais locais de assistência à saúde, são ambientes repletos de microrganismos, muitos deles causadores de doenças. Isso faz com que estes lugares sejam propícios para causar as famosas **infecções hospitalares (IH)**, também chamadas de **"infecções relacionadas à assistência à saúde" (IRAS)**.



Estas infecções não ocorrem somente pelo fato de o ambiente hospitalar ter muitas bactérias ou vírus. Outros fatores também facilitam a ocorrência destes quadros, como, por exemplo, o fato de muitos pacientes atendidos nestes locais estarem **imunocomprometidos**, ou serem constantemente submetidos a **procedimentos invasivos** que facilitam a entrada destes microrganismos no corpo. Assim, as infecções hospitalares são uma grande causa de preocupação para os profissionais de saúde e para os pacientes, pois podem ter diversas consequências negativas.

Entre os principais problemas causados pelas infecções hospitalares podemos citar:

- O aumento no tempo de internação dos pacientes no hospital;
- Elevação nos custos de tratamento;
- Maiores taxas de morbimortalidade dentro dos hospitais;
- Aumento dos riscos jurídicos de ações contra as instituições de saúde.

Então vamos tentar entender um pouco mais sobre esse assunto?

7.1 - Infecções hospitalares

De acordo com a **Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998** (que dispõe sobre o controle de infecções hospitalares), **infecção hospitalar (IH)** "é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares". Em outras palavras, podemos dizer que são infecções adquiridas no ambiente hospitalar (ou em outros locais de assistência à saúde), de modo que estas podem então se manifestar durante o período de internação ou após a alta do paciente.

Podemos considerar que é um quadro de infecção hospitalar nos seguintes casos:

- Quando o paciente dá entrada no hospital sem evidência de infecção e **não se sabe o período de incubação** do microrganismo causador, consideramos então infecção hospitalar as manifestações infecciosas que ocorram **a partir de 72 horas** da admissão do paciente.
- Também são considerados casos de infecção hospitalar aqueles que se manifestam **antes das 72 horas**, desde que seja possível relacionar o quadro infeccioso com **procedimentos médicos** que tenham sido realizados dentro deste período de tempo.
- No caso de infecções em **recém-nascidos**, **todas** são consideradas infecções hospitalares, com **exceção dos casos de infecções transplacentárias** (aquelas transmitidas da mãe para o bebê) e em casos de **bolsa rota superior a 24 horas**.
- Quando um paciente vem de um **outro hospital** e é **internado com um quadro de infecção** também é considerado um caso de infecção hospitalar, só que neste caso adquirido no hospital de origem.



7.2 - Infecções comunitárias

A **infecção comunitária** é basicamente aquela que **não está relacionada com o ambiente hospitalar**, tendo sido **adquirida na comunidade**. É importante dizer que estas infecções podem ser identificadas ou até mesmo se manifestar dentro do ambiente hospitalar, mas não foram adquiridas nele. Na Portaria 2616/98, a definição encontrada para infecção comunitária é a seguinte: "**é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital**".

Podemos considerar um quadro de infecção comunitária nas seguintes situações:

- Quando há **agravamento ou extensão de uma infecção** que já estava presente no momento da admissão do paciente. Nestes casos, deve-se verificar se não há indícios de que tenha havido uma nova infecção que possa ter sido adquirida após a entrada do paciente no hospital.
- Também consideramos infecção comunitária os casos de infecção em **recém-nascidos** identificados **logo após o nascimento** em que se constate **transmissão transplacentária**. Alguns exemplos de doenças que tenham infecção transplacentária são: **sífilis, toxoplasmose, rubéola, herpes simples, AIDS e citomegalovirose**.
- Os casos de infecção em **recém-nascidos** que estejam relacionados a **bolsa rota superior a 24 horas** também são considerados infecção comunitária.

7.3 - Infecção hospitalar e a questão dos antibióticos

Um ponto importante relacionado às infecções hospitalares é a questão da **resistência bacteriana**. Vamos ver a seguir uma questão que aborda este assunto.



(CESPE - EBSERH - 2018) Um dos perigos do uso indiscriminado dos antimicrobianos é o desenvolvimento de resistência a fármacos em razão da eliminação dos microrganismos sensíveis.

Certo.

Errado.



Comentários:

A afirmativa da questão acima está **correta**. As bactérias são organismos capazes de se adaptar rapidamente às mudanças no ambiente. Quando são expostas a agentes antimicrobianos de forma inadequada ou acentuada, algumas bactérias podem **adquirir resistência aos fármacos**, não respondendo mais aos seus efeitos. O problema nos hospitais e ambientes de assistência à saúde é que os antimicrobianos são amplamente utilizados nos tratamentos, o que eleva a concentração de **cepas resistentes** nestes locais. Isso ocorre porque os antibióticos conseguem eliminar apenas as bactérias que são sensíveis a eles, mas **não atuam sob aquelas que adquiriram resistência**. Este é um fator de grande preocupação, pois as infecções hospitalares causadas por **bactérias multirresistentes** são ainda mais perigosas por **não responderem bem ao tratamento**.

Gabarito: Certo.

Uma outra questão preocupante quanto ao uso de antimicrobianos são os **danos causados à microbiota natural** dos indivíduos tratados com estes fármacos. Este assunto é abordado, por exemplo, na questão abaixo.



(CESPE - EBSEH - 2018) A supressão da microbiota normal cria um ambiente que tende a ser preenchido por microrganismos oportunistas, capazes de se tornar patógenos.

Certo.

Errado.

Comentários:

A afirmativa acima também está **correta**. Quando o paciente é tratado com antibióticos, os fármacos não destroem apenas os microrganismos patogênicos, mas acabam atingindo também aqueles que estão naturalmente presentes no nosso organismo compondo a nossa **microbiota natural**. A microbiota natural é também uma fonte de **defesa do corpo**, e o seu comprometimento acaba dando espaço para o surgimento de **infecções oportunistas**. Estas infecções são causadas por microrganismos que já estão presentes no organismo, mas que em situações normais (quando estão equilibrados), não nos causam danos. No entanto, o tratamento com antimicrobianos acaba **desequilibrando a microbiota natural**, permitindo a proliferação exacerbada de alguns microrganismos, causando assim quadros infecciosos. Este tema é bastante relevante, pois **grande parte dos casos de infecção hospitalar é causada por microrganismos oportunistas** em virtude do fato de muitos pacientes internados estarem com suas defesas naturais comprometidas.



Gabarito: Certo.

7.4 - Prevenção e controle das infecções hospitalares

Embora as infecções hospitalares sejam assunto de muita preocupação, elas podem ser prevenidas com medidas relativamente simples. Por exemplo, a **forma individual mais simples, eficaz e menos dispendiosa no combate às infecções hospitalares** é **lavar as mãos**. Isso mesmo! Esta atitude ajuda – e muito – a **prevenir a disseminação de microrganismos** nestes locais. Lavar corretamente as mãos é um procedimento que deve ser realizado sistematicamente dentro de ambientes hospitalares, não só pelos **profissionais da saúde**, mas também pelos **pacientes** e **visitantes**.

Para os profissionais de saúde, a recomendação é que higienizem corretamente as mãos quantas vezes forem necessárias no atendimento a um único paciente, quando houver **contato com vários sítios corporais**. A higienização das mãos também é **indispensável antes e após o atendimento de qualquer paciente**, para evitar de levar microrganismos de um leito para outro. Mesmo em situações em que não haja o toque direto do profissional de saúde com o paciente, a higienização das mãos ainda é importante quando há **contato com objetos que estejam próximos** ao mesmo, pois estes também podem ser fontes de contaminação e precisam ser mantidos limpos. Outro ponto importante é que o uso de luvas não dispensa a lavagem das mãos, em particular quando há contato com mucosas, sangue, fluidos corporais, secreções ou excreções. Nas instituições de saúde é muito importante que sejam implementadas medidas que ajudem a incorporar a prática da higienização correta das mãos pelos seus funcionários em todos os níveis de assistência. A figura a seguir mostra o método correto da **lavagem simples das mãos**.



Higienização Simples das Mãos



1. Abra a torneira e molhe as mãos, evitando encostar na pia.



2. Aplique na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir todas as superfícies das mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante).



3. Ensaboe as palmas das mãos, friccionando-as entre si.



4. Esfregue a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda (e vice-versa) entrelaçando os dedos.



5. Entrelace os dedos e fricção os espaços interdigitais.



6. Esfregue o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta (e vice-versa), segurando os dedos, com movimento de vai-e-vem.



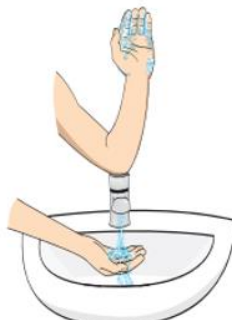
7. Esfregue o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda (e vice-versa), utilizando movimento circular.



8. Fricção as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fechada em concha (e vice-versa), fazendo movimento circular.



9. Esfregue o punho esquerdo, com o auxílio da palma da mão direita (e vice-versa), utilizando movimento circular.



10. Enxágue as mãos, retirando os resíduos de sabonete. Evite contato direto das mãos ensaboadas com a torneira.



11. Seque as mãos com papel-toalha descartável, iniciando pelas mãos e seguindo pelos punhos.

Para a técnica de Higienização Anti-séptica das mãos, seguir os mesmos passos e substituir o sabonete líquido comum por um associado a anti-séptico.

A Portaria 2616/98 recomenda ainda que a **lavagem das mãos seja feita com antisséptico** nos seguintes casos:

- Na realização de **procedimentos invasivos**;
- Na prestação de cuidados a **pacientes críticos**;
- E no contato direto com **feridas abertas** ou **dispositivos invasivos** como cateteres e drenos.

Embora a higienização das mãos seja uma medida fundamental, infelizmente ela não é suficiente para combater sozinha as infecções hospitalares. Outras ações também se mostram fundamentais, como por exemplo adotar **medidas conscientes do uso de antimicrobianos** dentro do ambiente hospitalar, visando assim **diminuir os casos de resistência bacteriana**. Além disso, os **procedimentos médicos invasivos**, como cirurgias, por exemplo, devem ser realizados sob **critérios rigorosos de assepsia** a fim de minimizar as chances de infecções. Também é fundamental que o ambiente hospitalar como um todo seja sempre higienizado rigorosamente, seguindo as instruções dos órgãos responsáveis.

Outro ponto importante, é que cada hospital ou instituição de saúde deve formar a sua **Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH)**. Este órgão deverá ser constituído por **profissionais da saúde** e será responsável por executar as **ações de controle de infecção hospitalar** dentro da sua instituição.

Para maiores esclarecimentos quanto as recomendações de controle de infecções hospitalares e sobre as atribuições e determinações dos CCIHs, recomendo a leitura da **Portaria Nº 2616 de 12 de maio de 1998**.

A seguir, estudaremos sobre a microbiologia da água e dos alimentos.



8 - Microbiologia da água e dos alimentos

8.1 - Aspectos gerais

A água e os alimentos que consumimos todos os dias também contêm microrganismos, assim como tudo ao nosso redor. No entanto, é muito importante que haja um **padrão microbiológico** estabelecido para os alimentos destinados ao consumo humano. Este padrão microbiológico é o que determina **quais microrganismos são aceitáveis nos alimentos e em quais concentrações**. Além disso, este padrão também avalia a **presença/ausência e a concentração de toxinas e metabólitos** de microrganismos nos alimentos e na água.

Estes parâmetros são muito importantes de serem estabelecidos, pois a contaminação por microrganismos pode levar ao surgimento das chamadas **Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)**. Um dos sintomas mais comuns do consumo de alimentos contaminados, por exemplo, é o **desconforto gastrointestinal**, que pode até não ser algo muito preocupante, no entanto, alguns casos de **intoxicação alimentar podem levar a quadros graves de infecção**. Por isso, para evitar este tipo de doença, tanto a água quanto os alimentos destinados ao consumo humano devem passar por **análises microbiológicas** regulares que irão avaliar se eles estão próprios para o consumo.

Devido à importância deste tema, a indústria alimentícia deve seguir padrões sanitários rigorosos em seus procedimentos, visto que muitas vezes a contaminação da água e dos alimentos ocorre por falhas no processo de produção dessas indústrias, tais como: higienização ineficiente no ambiente de manipulação dos alimentos, produtos fora do prazo de validade, água com problemas de qualidade, armazenagem inadequada dos produtos, temperatura incorreta do local de trabalho e de manipulação, e muitos outros.

O **órgão responsável pela fiscalização, controle e regulamentação de produtos que envolvem a saúde pública** – o que inclui alimentos, bebidas e água – é a **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Em 2001, a ANVISA estabeleceu a **RDC nº 12**, que fala sobre os **padrões microbiológicos sanitários para os alimentos**. Esta RDC traz os padrões microbiológicos aceitáveis para diversos grupos de alimentos. Por tratar-se de um conteúdo bastante extenso e específico, não seria viável abordá-la por completo nesta aula, mas recomendo que vocês façam a leitura do documento. Recomendo também a leitura da **Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011**, que legisla sobre a **qualidade da água potável no território nacional**, e a leitura complementar da **RDC nº173 de 13 de setembro de 2006**, que aborda as **boas práticas para produção e comercialização de água mineral natural e de água natural**.

A seguir, vamos ver um exemplo de como as especificações estabelecidas na RDC nº 12 /2001 podem ser abordadas em uma questão de prova.





(URI - Pref. Pref. Santo Ângelo/RS - 2019) Com base no Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, aprovado pela RESOLUÇÃO RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001, pode-se afirmar que todas as alternativas são corretas, EXCETO a:

A) DTA é a sigla para Doença Transmitida por Alimento, causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico.

B) A colheita de amostras dos alimentos para análise microbiológica deve ser realizada em suas embalagens originais não violadas, observando a quantidade mínima de 200g ou 200mL por unidade amostral. Quando se tratar de produtos a granel, ou de porções não embaladas na origem, deve-se cumprir as Boas Práticas de Colheita constantes nas referências da resolução.

C) No plano de amostragem proposto na resolução, m é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável, e M é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

D) A denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes total". A denominação "coliforme termotolerantes" corresponde a "coliforme fecal".

Comentários:

Como podemos observar, para resolver a questão acima é necessário recorrer à RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Por este motivo, reforço a importância da leitura mais detalhada do documento. Agora vamos ver a resolução desta questão.

Letra A: correta. Como pode ser visto na RDC nº 12, o conceito de DTA é "Doença Transmitida por Alimento, causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico".

Letra B: correta. O item 5.2 da RDC nº 12 traz o seguinte: "Deve-se proceder a colheita de amostras dos alimentos em suas embalagens originais não violadas, observando a quantidade mínima de 200g ou 200mL por unidade amostral. Quando se tratar de produtos a granel, ou de porções não embaladas na origem, deve-se cumprir as Boas Práticas de Colheita...".

Letra C: correta. No item 5.8.1 da RDC nº 12 é possível encontrar as definições especificadas da afirmativa. Observa-se neste item que: "m é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável". "M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis".

Letra D: ERRADA. De acordo com o item 5.9.1 da RDC nº 12 de 2001, o termo "**coliformes à 45°C**" é equivalente aos termos "**coliformes termotolerantes**" e "**coliformes de origem fecal**" (coliformes fecais). **Este é o nosso gabarito.**



8.2 - Microrganismos relevantes: o grupo coliforme

No processo de avaliação microbiológica dos alimentos, alguns microrganismos específicos devem ser pesquisados mais atentamente, de modo que alguns deles **não podem estar presentes nem mesmo em baixas concentrações**, pelo fato de representarem **risco à saúde humana**. Alguns dos microrganismos, ou grupos de microrganismos, citados pela RDC 12 de 2001 são: **coliformes a 45°** (termo que equivale a "**coliformes termotolerantes**" ou "**coliformes fecais**"), *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Daremos destaque ao grupo dos coliformes devido à sua grande relevância para o assunto. Os **coliformes** constituem um grupo composto por mais de 20 espécies de bactérias, sendo que algumas delas habitam o trato gastrointestinal de animais e do homem, como é o caso da *Escherichia coli*. A relevância das bactérias deste grupo para o controle microbiológico da água e dos alimentos é que elas são boas **marcadoras de contaminação fecal e indicadoras das condições de higiene**. Na análise da qualidade da água, por exemplo, as bactérias do grupo coliforme são amplamente empregadas para verificar a potabilidade.

Os coliformes podem ser classificados em: coliformes totais e coliformes termotolerantes. Os **coliformes totais** são **enterobactérias Gram-negativas**, podendo ser aeróbias ou anaeróbias e não produtoras de esporos. As bactérias deste grupo são capazes de **fermentar a lactose produzindo gás a 35°C no período de 24 a 48 horas**. Esta última característica em particular oferece a base para os testes tradicionais empregados na identificação dos coliformes totais. Já os **coliformes termotolerantes**, também conhecidos como **coliformes fecais**, são bactérias que se diferenciam dos coliformes totais por serem capazes de **fermentar lactose e produzir gás à temperatura de aproximadamente 45°C em 24 horas**. O nome "coliformes fecais" se deve ao fato de que inicialmente pensava-se que todas as bactérias deste grupo eram de origem fecal. No entanto, atualmente sabe-se que outras bactérias que não possuem origem fecal também se enquadram nesta classificação, daí surgiu então o termo mais adequado: "**termotolerantes**".

A seguir vamos ver melhor como a questão dos coliformes poderia ser abordada em uma questão de prova.



(Fundação Aroeira - Pref. Taquaral de Goiás/GO - 2019) A garantia de segurança e potabilidade da água depende do funcionamento adequado de diversas etapas no processo de abastecimento, que vão desde o tratamento até a distribuição; e, caso alguma delas apresente falhas, poderá haver processo de contaminação. Os coliformes totais e termotolerantes são os indicadores de contaminação mais usados para monitorar a qualidade sanitária da água. A respeito das características microbiológicas do grupo de coliformes totais, assinale a alternativa CORRETA:



- A) São bacilos gram-positivos, não esporulados, aeróbios, com capacidade de fermentar a lactose, produzindo gás a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24 a 48 horas.
- B) São bacilos gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, com capacidade de fermentar a lactose, produzindo gás a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24 a 48 horas.
- C) Os coliformes termotolerantes são bactérias capazes de fermentar a lactose, produzindo gás em 28 horas, com temperaturas variando entre $44,5^{\circ}\text{C}$ e $46,5^{\circ}\text{C}$.
- D) Os coliformes termotolerantes são bacilos gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, com capacidade de fermentar a lactose, produzindo gás entre $42,0^{\circ}\text{C}$ a $46,5^{\circ}\text{C}$, em 28 horas.

Comentários:

Como se pode observar, a questão acima aborda as características do grupo dos coliformes totais. Vejamos a resolução dessa questão de forma detalhada.

Letra A: errada. A afirmativa está errada em dois pontos. Primeiramente, os coliformes totais são bacilos **Gram-negativos** e não Gram-positivos, como está colocado na afirmação. Em segundo lugar, as bactérias deste grupo **podem ser também anaeróbias facultativas** e não apenas aeróbias como foi afirmado.

Letra B: correta. A afirmação está certa em todos os aspectos. Os coliformes totais se caracterizam por serem bacilos Gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos e capazes de fermentar lactose com produção de gás a 35°C (com pequena variação) dentro do período de 24 e 48 horas. **Este é o nosso gabarito.**

Letra C: errada. Primeiramente, esta afirmativa está errada pois fala sobre os **coliformes termotolerantes**, quando na verdade a questão está perguntando sobre o grupo de coliformes totais. Como vimos anteriormente, os coliformes totais e os coliformes termotolerantes são grupos distintos. Além disso, a afirmativa está errada quando diz que os coliformes termotolerantes produzem gás em 28 horas, o período correto seria o de **24 horas**. A afirmação também está incorreta quanto à temperatura, pois na verdade a fermentação da lactose com produção de gás ocorre a uma **temperatura de $44,5^{\circ}\text{C}$, podendo variar apenas cerca de $0,2^{\circ}\text{C}$ para mais ou para menos**, estando assim a temperatura de $46,5^{\circ}\text{C}$ fora desta faixa.

Letra D: errada. Esta afirmativa também trata dos **coliformes termotolerantes** e não dos coliformes totais, como foi questionado. Os outros erros estão na faixa de temperatura e no período de tempo afirmados. O correto para os coliformes termotolerantes seria a **temperatura de $\sim 44,5^{\circ}$** e o **tempo de 24 horas**.

8.3 - Bactérias heterotróficas

São consideradas bactérias heterotróficas todas aquelas que se **alimentam de matéria orgânica** oriunda de outros seres vivos. O grupo de **coliformes**, que contém os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia*, está incluso dentro da classificação de bactérias heterotróficas. Essas bactérias podem ser encontradas em vários ambientes, como a **água**, o **solo**, os **alimentos** e o **ar**.

A maioria das bactérias heterotróficas não é patogênica. No entanto, algumas são capazes de causar **doenças em humanos**, sobretudo em indivíduos **imunossuprimidos**. Por este motivo, a **análise de bactérias heterotróficas na água** se torna muito importante, sendo que a presença de altas concentrações



dessas bactérias pode estar associada a **falhas no processo de tratamento de água** ou a algum fator que esteja proporcionando **contaminação pós-tratamento**, como caixas d'água mal higienizadas, corrosão ou presença de biofilmes nas tubulações.

A contagem de bactérias heterotróficas é útil para **determinar a qualidade bacteriológica da água** de uma forma geral, uma vez que a análise é inespecífica, pois detecta bactérias que consomem matéria orgânica. Essa análise pode ser feita através da técnica de **spread plate** (que será detalhada mais adiante), espalhando-se a solução de forma uniforme para facilitar a contagem das bactérias que crescem na placa.

A **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece parâmetros de potabilidade em relação às bactérias heterotróficas.



Art. 28. A determinação de bactérias heterotróficas deve ser realizada como um dos parâmetros para avaliar a integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

*§ 1º A contagem de bactérias heterotróficas deve ser realizada em **20% (vinte por cento) das amostras mensais** para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição (reservatório e rede).*

§ 2º Na seleção dos locais para coleta de amostras devem ser priorizadas pontas de rede e locais que alberguem grupos populacionais de risco à saúde humana.

*§ 3º Alterações bruscas ou acima do usual na contagem de bactérias heterotróficas devem ser investigadas para identificação de irregularidade e providências devem ser adotadas para o restabelecimento da integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), recomendando-se que **não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL**.*

8.4 - Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA)

As chamadas doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são causadas pela **ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas** por organismos patogênicos (infecciosos, toxinogênicos ou infestantes) ou por toxinas produzidas por alguns tipos de microrganismos. A contaminação alimentar também pode ocorrer por produtos químicos ou quaisquer objetos ou substâncias que tenham o potencial de causar doenças. No entanto, a maioria das DTHAs é causada por **bactérias**, suas **toxinas**, **vírus** e outros **parasitas**.



Existem mais de 250 tipos de DTHAs e elas representam importante **morbimortalidade** em todo o mundo. Dentre as principais doenças, pode-se citar: cólera, febre tifoide, doenças diarreicas agudas, rotavírus/norovírus, botulismo e doença de Creutzfeldt-Jakob.

8.5 - Métodos de análises microbiológicas em água e alimentos

Existem diversos tipos de metodologias diferentes que podem ser aplicadas para as análises microbiológicas da água e dos alimentos. A escolha do melhor método vai depender, por exemplo, de qual é o microrganismo, ou o grupo de microrganismos que se está investigando. No entanto, podemos observar que a maior parte destas metodologias é baseada em **culturas microbiológicas simples**.

Para fins didáticos, podemos dividir os métodos de análise microbiana em métodos quantitativos e qualitativos. Os **métodos quantitativos** são usados para avaliar a **quantidade/concentração dos microrganismos** na amostra. Já os **métodos qualitativos** buscam **identificar e classificar os microrganismos** encontrados, destacando-se os testes chamados de **presença/ausência**. Neste último caso, procura-se verificar se um microrganismo específico está presente ou não em uma amostra; para isso, uma alíquota da mesma deve ser colocada em uma solução de enriquecimento que irá fornecer as condições necessárias para este microrganismo se desenvolver, caso ele esteja presente.

8.5.1 - Métodos quantitativos:

- **Método do Número mais provável (NMP)**: este método propõe – como o próprio nome diz – verificar o número mais provável de um determinado microrganismo alvo presente em uma amostra. A técnica consiste em colocar alíquotas da amostra em diferentes tubos contendo um meio específico e seletivo. Espera-se, deste modo, que o número de tubos que apresentarem crescimento do microrganismo, ou não, correlacione-se com o número de microrganismos presentes na amostra. Esta relação é verificada através de uma tabela já estabelecida a partir de cálculos de probabilidade que permitem, assim, verificar o número mais provável de microrganismos baseado nas quantidades de tubos "positivos" e "negativos" encontrados no teste.
- **Técnicas por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)**: trata-se de um método **menos sensível que a técnica de NMP**, mas oferece a vantagem de utilizar **menos material e espaço** para sua execução. Estas técnicas baseiam-se no pressuposto de que cada célula bacteriana, quando fixada em um meio de cultura sólido propício, irá originar uma colônia individual e visível.
 - a. **Pour Plate – Semeadura em profundidade**: nesta técnica de plaqueamento, uma alíquota da amostra diluída deve ser colocada no fundo da Placa de Petri enquanto o meio de cultura fundido é colocado por cima. Esta técnica permite identificar **até 10 UFC/g para amostras sólidas e até 1 UFC/ml para amostras líquidas**. É uma técnica



empregada para contagem total de aeróbios mesófilos e também para contagem de enterobactérias, bactérias lácticas, enterococos e de clostrídios sulfito redutores.

- b. **Spread Plate – Semeadura em superfície:** neste tipo de semeadura, a alíquota da amostra diluída é colocada por cima (na superfície) do meio de cultura já solidificado na placa. Esta técnica possui algumas vantagens como: **permitir a visualização de características morfológicas das colônias**, por exemplo. O método possibilita a detecção de **até 100 UFC/g para amostras sólidas e de até 10 UFC/ml para amostras líquidas**. Trata-se de um método utilizado para a contagem total de aeróbios psicrotróficos (microrganismos que crescem em baixas temperaturas), mesófilos, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e também para contagem de bolores e de leveduras.



Bactérias Lácticas

Estas são um grupo de bactérias que apresentam o **ácido láctico** como **principal produto do seu metabolismo**. Estas bactérias possuem como característica a fermentação de carboidratos. Sua determinação em alimentos é importante pois algumas podem ser causa de infecções e doenças humanas. A contagem destas bactérias em alimentos pode ser realizada por meio da técnica de **Pour Plate (semeadura em profundidade)** ou por meio de **incubação anaeróbica**. A incubação anaeróbia pode ser realizada com a **jarra de Gaspak**, também conhecida como "**jarra de anaerobiose**" por criar um ambiente anaeróbico.

Aeróbios mesófilos

Aeróbios mesófilos são microrganismos aeróbios que se desenvolvem em **temperaturas moderadas**, mais ou menos entre 10° e 45°C, sendo a faixa dos 30°C considerada ideal. Este grupo inclui a maior parte dos microrganismos que são contaminantes de origem animal em alimentos, por isso, é um dos **indicadores de qualidade mais empregados**. A contagem total destes microrganismos pode ser realizada por técnicas de semeadura utilizando meio ágar padrão para contagem (**PCA – Plate Count Agar**). Este meio é utilizado para **contagem de bactérias**, mas **não permite a diferenciação das mesmas**.

O resultado das contagens em placas é dado pela unidade de medida **UFC (unidades formadoras de colônia)**, deste modo, podemos ter **UFC/g** ou **UFC/ml**. O resultado dessas contagens relaciona o número de



colônias com o número de unidades formadoras de colônia, e não necessariamente com o número de células microbianas.

8.5.2 - Métodos qualitativos:

Os métodos qualitativos procuram identificar a **presença ou ausência** de um microrganismo alvo baseando-se em suas características e propriedades, **não se preocupando em estabelecer quantidade**. Os métodos qualitativos, de um modo geral, utilizam **uma etapa de enriquecimento, seguida do isolamento do microrganismo em meio sólido**. Vamos conhecer um pouco mais sobre estas etapas:

- **Enriquecimento:** o enriquecimento consiste em possibilitar o desenvolvimento de microrganismos presentes em uma amostra, que muitas vezes estão em quantidades pequenas e naturalmente não detectáveis. Com esta etapa esses microrganismos podem se desenvolver e, deste modo, serem detectados e identificados.
- **Isolamento em meio sólido:** esta etapa consiste na utilização de meios seletivos que favorecem o crescimento de microrganismos alvo. Esta etapa é seguida da confirmação que consiste na avaliação das características específicas do microrganismo que se está investigando para determinar a sua identidade.



(VUNESP - EBSERH - 2020) Os padrões legais aceitos para potabilidade de água para consumo humano no Brasil são estabelecidos pelas legislações:

- A) RDC – 274/2005, RDC – 91/2016 e Portaria 2.914 de dezembro 2011.
- B) RDC – 306/2004, Portaria 2.914 de dezembro 2011 e RDC – 316/2019.
- C) RDC – 302/2005, RDC – 274/2005 e RDC – 50/2002.
- D) RDC – 50/2002, RDC – 306/2004 e RDC 302/2005.
- E) RDC – 222/2018, RDC – 302/2005 e RDC – 91/2016.

Comentários:

As legislações que estabelecem os padrões legais aceitos para potabilidade de água para consumo humano no Brasil são:

Resolução nº 274, de 22 de setembro de 2005: aprova o regulamento técnico para águas envasadas e gelo;



Resolução - RDC nº 91, de 30 de junho de 2016: dispõe sobre as Boas Práticas para o Sistema de Abastecimento de Água ou Solução Alternativa Coletiva de Abastecimento de Água em Portos, Aeroportos e Passagens de Fronteiras.

Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011: dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Gabarito: alternativa A.

Finalizamos aqui a teoria pertinente à aula de hoje.



9 - Considerações Finais

Chegamos ao final de mais uma aula.

Nesta aula iniciamos o estudo da Microbiologia a partir dos principais procedimentos laboratoriais. Também vimos um pouco sobre controle da infecção hospitalar e microbiologia da água e dos alimentos.

O conteúdo de Microbiologia é muito extenso, então procurei enfatizar os assuntos mais cobrados em provas de concurso. Estudem bastante e não se esqueçam de praticar com as questões comentadas disponibilizadas ao final da aula.

Aguardo vocês na próxima aula. Até lá!

Ana Cristina Lopes

Instagram: <https://www.instagram.com/prof.anacristinalopes/>



LISTA DE QUESTÕES



Procedimentos laboratoriais

1. (Crescer Consultorias - Prefeitura de Paulistana - 2019 - adaptada) A coloração de Gram é um passo muito importante na caracterização e classificação inicial das bactérias. Esse método de coloração permite que as bactérias sejam visualizadas no microscópio óptico, uma vez que sem a coloração é impossível observá-las ou identificar sua estrutura. O procedimento correto da coloração é:

- A) Coloração com violeta de cristal; Adição de mordente (lugol); A descoloração (utilizando etanol/acetona); A contra-coloração (utilizando corante Safranina, vermelho).
- B) Cobrir a lâmina com fucsina fenicada, Lavar com água corrente; Cobrir a lâmina com álcool-ácido 3% até descorar totalmente o esfregaço; Lavar com água corrente; Cobrir a lâmina com azul de metileno durante 1 minuto; Lavar com água corrente.
- C) Submergir a lâmina de gram a uma solução de triarilmetano a 0,1%, uma solução de xantenos a 0,1% e a uma solução de tiazinas a 0,1%
- D) Depositar o corante Azul de Metileno sobre o esfregaço previamente fixado deixando-se corar por 3 a 5 minutos. Em seguida escorre-se o corante, lava-se em água corrente.

2. (UNIFESP - 2018) A coloração de Gram é uma das principais técnicas para avaliação das características morfotintoriais das bactérias. Sabendo o princípio e as diferentes etapas desta técnica de coloração, qual seria a consequência caso houvesse uma inversão de ordem das etapas e o técnico em microbiologia submetesse a amostra à solução de álcool a 95% antes de tratar a amostra com lugol?

- A) O álcool pode ser adicionado em qualquer etapa da coloração de Gram; portanto, a troca não altera o resultado final.
- B) O lugol funciona como descorante, retirando o excesso de cristal violeta, deixando todas as bactérias coradas em roxo.
- C) As bactérias Gram-negativas serão coradas pelo cristal violeta.
- D) As bactérias Gram-positivas serão descoradas pela ação do álcool.



E) O lugol permitirá que as bactérias Gram-negativas apresentem a coloração roxa.

3. (IBADE - Pref. Ji-Paraná/RO - 2018) A coloração de Gram é a mais utilizada na rotina de microbiologia clínica. Nessa coloração, as bactérias são expostas ao álcool 95% ou a uma solução de acetona/álcool. A importância desse passo na técnica dessa coloração é:

- A) permite que o corante púrpura seja liberado das células bacterianas, pois causa o rompimento da membrana externa.
- B) facilita a entrada do corante púrpura dentro das células Gram-negativas.
- C) forma um complexo com a solução de iodo presente nesta coloração.
- D) responsável pela adesão das células às lâminas.
- E) retém o corante púrpura dentro de todos os tipos bacterianos.

4. (INSTITUTO AOCP - SES-PE - 2018) A bacterioscopia consiste na avaliação da presença de bactérias em materiais biológicos. A coloração de Gram é uma técnica muito utilizada no laboratório de análises clínicas no setor de microbiologia, para diferenciar os microrganismos com base na composição química e integridade da parede celular, o que permite diferenciá-las em Gram-positivas e Gram-negativas. Das alternativas a seguir, qual apresenta a sequência correta do método de Coloração de Gram?

- A) Cristal de violeta, álcool cetona, lugol, safranina.
- B) Cristal de violeta, lugol, álcool cetona, azul de cresil brilhante.
- C) Cristal de violeta, álcool cetona, lugol, fucsina.
- D) Cristal de violeta, lugol, azul de metileno, fucsina.
- E) Cristal de violeta, lugol, álcool cetona, fucsina/safranina.

5. (UECE - SES-CE - 2006) O laboratório de microbiologia exerce importante papel no controle da infecção hospitalar, orientando os procedimentos corretos quanto à coleta e transporte de amostras biológicas destinadas às culturas no laboratório. Quanto ao material biológico e seu modo, apropriado, de coleta e tempo crítico para entrega ao laboratório, podemos afirmar, corretamente.

- A) O líquido deve ser colhido em tubo seco estéril e, imediatamente após a coleta, ser entregue ao laboratório sob refrigeração.



- B) O líquido pleural deve ser colhido em tubo seco estéril e enviado imediatamente ao laboratório, não podendo ser refrigerado.
- C) O sangue destinado às hemoculturas deve ser colhido com EDTA, podendo ser refrigerado.
- D) Material do trato respiratório deve ser colhido em tubo seco estéril e enviado ao laboratório em até 24 horas.

Meios de cultura e provas de identificação

6. (IBFC - EBSERH - 2020) Analise as afirmativas abaixo e dê valores Verdadeiro (V) ou Falso (F).

- I. () O meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, tais como *Salmonella* e *Shigella*.
- II. () O meio de Thayer-Martin é um meio rico e superior a outros meios de cultivo destinados para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*.
- III. () O meio de Ágar Mac Conkey contém cristal violeta que inibe o crescimento de microrganismos Gram negativos.
- IV. () O meio de Ágar sangue permite a verificação de hemólise dos *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*

Assinale a alternativa que apresenta a sequência correta de cima para baixo.

- A) V, V, F, F
- B) F, F, F, F
- C) V, V, V, F
- D) F, F, F, V
- E) F, V, F, V

7. (VUNESP - EBSERH - 2020) Assinale alternativa que apresenta meios de cultura seletivos.

- A) Agar Salmonella-Shigella (SS), Agar Chocolate e Meio de Löwenstein Jensen.
- B) Agar Salmonella-Shigella (SS), Agar Mueller Hinton e Agar Thayer-Martin chocolate.
- C) Agar chocolate, Agar Thayer-Martin e Agar Mueller Hinton.
- D) Agar Thayer-Martin chocolate, Agar Salmonella-Shigella (SS) e Meio de Löwenstein Jensen.
- E) Agar chocolate, Agar Mueller Hinton e Meio de Löwenstein Jensen.



8. (ADVISE - Pref. Juarez Tavorá/PB - 2019) Os meios de cultivo devem conter as substâncias exigidas pelas bactérias para o seu crescimento e multiplicação. Para que possam fazer a síntese de sua própria matéria nutritiva devem dispor de fontes de carbono (proteínas, açúcares), fontes de nitrogênio (peptonas) e fontes de energia. São também necessários alguns sais inorgânicos, vitaminas e outras substâncias favorecedoras do crescimento. Classificação dos meios de cultivo quanto à consistência:

I- Meios líquidos: são aqueles em que os nutrientes estão dissolvidos em uma solução aquosa. O crescimento bacteriano nesse meio muda seu aspecto, ou seja o meio sofre uma turvação;

II- Meios semissólidos: são aqueles que possuem na sua composição, além dos nutrientes, uma pequena porcentagem de um polissacarídeo proveniente de algas marinhas, chamado ágar. São geralmente utilizados em tubos e a partir desse tipo de cultura é possível observar a motilidade bacteriana;

III- Meios sólidos: são aqueles que possuem uma porcentagem maior de ágar (cerca de 15 g/litro de água destilada), além dos nutrientes. Podem ser dispostos em tubos ou em Placas de Petri, dependendo da finalidade. Através do meio sólido em placas de Petri é possível, utilizando-se a técnica do esgotamento, conseguir o isolamento de colônias bacterianas e, portanto, é o meio ideal para que seja feito o estudo da morfologia colonial.

Dos itens acima:

- A) Apenas o item I está correto.
- B) Apenas os itens I e II estão corretos.
- C) Apenas os itens I e III estão corretos.
- D) Apenas os itens II e III estão corretos.
- E) Todos os itens estão corretos.

9. (COVEST-COPSET - UFPE - 2019) Nos meios de cultura ditos diferenciais ou indicadores, a coloração das colônias sofre interferência das reações que, em algumas espécies bacterianas, ocorrem com o substrato do meio. Deste modo, é possível identificar algumas espécies pelas características que apresentam suas colônias. Nos meios abaixo sinalizados, associe o aspecto das colônias, indicado na coluna da esquerda, com a espécie bacteriana mais provável, indicada na coluna da direita.

a. Agar Mac Conckey Colônias vermelhas



- b. Agar eosina azul de metileno Colônia com brilho verde metálico
- c. Agar sangue 5% Colônia com β hemólise
- d. Agar S-S Colônias incolores /róseas com centro negro

- 1) Salmonella tiphyurium
- 2) Estreptococos grupo A
- 3) Bacilos Gram negativo-Lactose +
- 4) Escherichia coli

A alternativa que indica a combinação correta é:

- A) a-4; b-2 c-1 ; d-3
- B) a-1 ; b-2; c-3; d-4
- C) a-3; b-4; c-2; d-1
- D) a-2; b-1; c-3; d-4
- E) a-4; b-3; c-2; d-1

10. (COVEST-COPSET - UFPE - 2019) Os meios de cultura podem ser classificados segundo seus objetivos funcionais ou sua composição. Observe os enunciados abaixo e assinale aquele que está correto.

- A) Meios enriquecidos são aqueles cujos componentes viabilizam a conservação dos microrganismos no laboratório.
- B) Meios seletivos permitem a separação de colônias de microrganismos através de reagentes indicadores.
- C) Meios diferenciais contêm nutrientes que inibem o crescimento de algumas espécies de microrganismos, permitindo o crescimento de outras.
- D) Meios de transporte têm composição nutritiva que garante a sobrevivência e carece de fontes de nitrogênio, impedindo a multiplicação dos microrganismos
- E) Meios nutritivos possuem quantidades de nutrientes suficientes para cultivar qualquer bactéria.

11.(COVEST-COPSET - UFPE - 2019) No tratamento de amostra biológica, para exame bacteriológico, é fundamental fornecer os nutrientes adequados para as possíveis bactérias contidas na amostra.



Associe os meios de cultura indicados na coluna da esquerda com as bactérias patogênicas (coluna da direita) que provavelmente serão favorecidas no crescimento.

MEIOS DE CULTURA	BACTÉRIAS
a. Ágar chocolate	1 - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
b. Meio de Lowenstein Jensen	2 - <i>Neisseria meningitidis</i>
c. Meio de Thayer Martin	3 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
d. Meio de Mac Conkey	4 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
e. Meio de Loeffler	5 - <i>Klebsiella pneumoniae</i>

A alternativa que indica a combinação correta é:

- A) a-2; b-4; c-1; d-5 e-3
- B) a-3; b-5; c-4; d-2; e-1
- C) a-5; b-2; c-3; d-4; e-1
- D) a-4; b-1; c-5; d-3 e-2
- E) a-1 ; b-3; c-4; d-2; e-5

12.(Crescer Consultorias - Prefeitura de Paulistana - 2019) Com relação à escolha de meios de cultura seletivos em relação ao agente está **INCORRETO**:

- A) *Corynebacterium diphtheriae* - Ágar cistinatelurito.
- B) *Legionella spp* - Ágar carvão-extrato de levedura tamponado.
- C) *Vibrio spp* - Ágar sangue Bordet-Gengou.
- D) *Neisseria* - Thayer Martin.

13.(COSEAC - UFF - 2019) O procedimento de identificação do microrganismo *Salmonella spp.* preconiza a caracterização de colônias incolores ou transparentes (lactose negativas) quando cultivadas no meio:

- A) caldo tetrationato.
- B) caldo Selenito.
- C) ágar Skirrow.
- D) ágar Mac Conkey.
- E) ágar Manitol Salgado.



14.(Fundação Aroeira - Pref. Palminópolis/GO - 2018) Os meios de cultura são composições de substâncias que fornecem nutrientes necessários para o crescimento de determinados microrganismos, sendo utilizados para realização dos exames laboratoriais microbiológicos. Ressalta-se que existem também os meios de cultura próprios para transporte e conservação de material biológico. Qual o meio de cultura adequado para transportar e conservar o material biológico, antes de sua inoculação para a realização de exames laboratoriais microbiológicos?

- A) Caldo Tioglicolato.
- B) Ágar chocolate.
- C) Ágar sangue.
- D) Cary Blair.

15.(IADES - SES-DF - 2014) O meio de ágar chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, embora cresçam nesse meio quase todos os tipos de microrganismos. A respeito desse meio de cultura, assinale a alternativa correta.

- A) Não é recomendada a utilização da base de BHI Ágar por apresentar crescimento deficiente de cepas exigentes.
- B) À base do meio deve ser adicionado sangue de frango, peru ou codorna desfibrinado.
- C) O meio deve ser levado a banho-maria a 85 °C, por 15 minutos, para que as hemácias litem e liberem hemina e hematina.
- D) Deve ser conservado entre -4 °C e -10 °C por três meses (tubos) e um mês (placas).
- E) A coloração original do meio é verde.

16.(IADES - SES-DF - 2014) Acerca do meio de cultura que é rico e superior a outros meios e utilizado para o isolamento de bactérias da família Neisseriaceae, assinale a alternativa correta.

- A) Ágar Mueller Hinton.
- B) Ágar Thayer Martin.
- C) Ágar MacConkey.
- D) Ágar Sangue.
- E) Ágar Cled.



17.(IADES - SES-DF - 2014) Assinale a alternativa que indica finalidade do ágar eosina azul de metileno (EMB).

- A) Meio seletivo, que inibe o crescimento dos coliformes fecais.
- B) Meio seletivo, usado para o isolamento e a identificação de estafilococos patogênicos.
- C) Meio não seletivo, ideal para ser utilizado em urocultura.
- D) Meio altamente nutritivo, onde crescem vários patógenos.
- E) Meio diferencial, utilizado no isolamento de enterobactérias.

18.(IADES - SES-DF - 2014) O meio de cultura Ágar S.S. é considerado adequado para o microrganismo

- A) *Salmonella-Shigella*.
- B) bacilos diftéricos.
- C) bacilo de Koch.
- D) *Vibrio cholerae*.
- E) pneumococos.

19.(NUCEPE/UESPI - FMS - 2011) Um farmacêutico, ao realizar uma cultura de secreções, isolou uma colônia de estafilococo, considerando que a próxima etapa é a identificação se a cepa é ou não *S. aureus*. A prova bioquímica de identificação presuntiva desta espécie é:

- A) catalase;
- B) coagulase;
- C) bacitracina;
- D) novobiocina;
- E) penicilinase.

Semeadura de materiais biológicos

20.(IADES - SES-DF - 2018) A pesquisa de bactérias e fungos no sangue é feita por meio da hemocultura. A esse respeito, assinale a alternativa correta.

- A) O método de coleta do sangue e o volume coletado não influenciam diretamente no resultado desse exame.



- B) A troca de agulhas entre a punção de coleta e a distribuição do sangue no frasco de hemocultura é recomendável.
- C) O volume ideal de sangue inoculado no meio de cultura deve corresponder a 10% do volume total do frasco de coleta.
- D) As punções arteriais são mais eficazes na recuperação dos microrganismos quando comparadas com punções venosas.
- E) A coleta através de cateteres ou cânulas deve prevalecer em relação à punção venosa.

21.(IADES - SES-DF - 2014) Acerca da coprocultura, é correto afirmar que

- A) esse tipo de procedimento é feito para a pesquisa de helmintos e protozoários nas fezes.
- B) o paciente, para a coleta do material, deve fazer uso de laxantes.
- C) a amostra, após a coleta, deve ser transportada em recipiente adequado, contendo meio Cary Blair.
- D) é indispensável para identificar agentes patogênicos causadores da tuberculose.
- E) o material a ser coletado é o escarro do paciente, obtido diretamente dos brônquios.

22.(UECE - SES-CE - 2006) Marque o material para o qual há necessidade de semear em caldo selenito.

- A) Líquido pleural.
- B) Urina.
- C) Fezes.
- D) Escarro.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

23.(Itame - Prefeitura de Edéia - GO - 2020) Marque o meio de cultura usado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antimicrobianos para as bactérias aeróbicas.

- A) Caldo Verde Brilhante
- B) Extrato de Malte
- C) Ágar Mueller Hinton
- D) Agar Nutriente



24.(COPESE - Prefeitura de Palmas - 2013) A respeito do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) utilizando discos de difusão, marque a alternativa CORRETA.

- A) O diâmetro dos halos de inibição de cada disco deve ser medido para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado.
- B) É indicativo de sensibilidade da bactéria ao antimicrobiano testado a presença de um halo de inibição, independente do diâmetro que este possui.
- C) Quando o tamanho do halo de inibição é igual para dois antimicrobianos diferentes em uma mesma cultura de bactérias significa obrigatoriamente que a cepa em questão possui sensibilidade idêntica aos dois fármacos.
- D) A concentração do antibiótico embebido no disco de papel é a mesma para os diferentes antimicrobianos testados.

Diagnóstico de infecções

25.(MSCONCURSOS - Pref. Jequié/BA - 2018) Menina com 3 anos de idade apresentava-se febril e estava com perda de apetite nas últimas 24 horas, e havia a dificuldade de acordá-la nas últimas 2 horas. A criança tem um histórico de desenvolvimento normal desde o nascimento. Apresenta-se com um histórico clínico bem semelhante ao de várias crianças que frequentam a mesma creche que ela. As imunizações estavam em dia. Um exame físico importante revelou que, ao seu pescoço ser fletido passivamente, ocorreu também flexão das pernas (sinal de Brudzinski positivo, sugerindo irritação nas meninges).

Analizando o caso clínico acima, qual das alternativas abaixo NÃO representa um achado laboratorial que poderia diagnosticar a doença?

- A) Na coloração de gram, constatou-se a presença de diplococos gram-negativos sugestivos de *Neisseria meningitidis*.
- B) Líquido cefalorraquiano límpido.
- C) Leucocitose.
- D) Hipoglicorraquia.

26.(IBADE - Pref. Ji-Paraná/RO - 2018) Dos microrganismos a seguir qual é o mais frequentemente encontrado nas faringites?

- A) *Chlamydia trachomatis*
- B) *Haemophilus influenzae*



- C) *Rickettsia sp*
- D) *Staphylococcus aureus*
- E) *Streptococcus pyogenes*

Controle da infecção hospitalar

27.(FUNDAÇÃO AROEIRA -PREF TAQUARAL DE GOIÁS/GO - 2019) Avalie os itens relacionados aos critérios de definição das infecções hospitalares (IH).

I - As infecções que acometem recém-nascidos transmitidas de forma transplacentária são definidas como IH.

II - IH são infecções adquiridas após a admissão do paciente e se manifestam exclusivamente após a alta, estando relacionada aos procedimentos hospitalares.

III - A IH pode manifestar-se antes de 72 horas de internação, quando associada a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados no hospital, durante esse período.

IV - É considerada IH quando se desconhece o período de incubação do microrganismo e não há evidência clínica e/ou laboratorial de infecção no momento da internação. A manifestação clínica se apresenta a partir de 72 horas após a admissão do paciente.

Assinale a única alternativa que apresenta o(s) item(ns) correto(s).

- A) IV, apenas.
- B) I e III, apenas.
- C) I e IV, apenas.
- D) III e IV, apenas.

28.(FAUEL - PREF CERRO AZUL/PR - 2016) De acordo com a Portaria Nº 2616/98, os Conceitos e Critérios diagnósticos das Infecções Hospitalares são:

I. Infecção comunitária - é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital.

II. Infecção comunitária - a infecção que está associada com complicação ou extensão da infecção já presente na admissão, a menos que haja troca de microrganismos com sinais ou sintomas fortemente sugestivos da aquisição de nova infecção.



III. Infecção comunitária - a infecção em recém-nascido, cuja aquisição por via transplacentária é conhecida ou foi comprovada e que se tornou evidente logo após o nascimento, como por exemplo: herpes simples, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose, sífilis e AIDS.

IV. Infecção hospitalar - é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

V. Infecção hospitalar - é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital.

- A) Todas as afirmações estão corretas.
- B) Apenas a afirmação V está incorreta.
- C) Apenas a afirmação I está incorreta.
- D) As afirmações I e III estão incorretas.

29.(COMPERVE - PREF DE BOA SAÚDE/RN - 2014) Atualmente, a segurança do paciente é uma das questões mais críticas para a Saúde. Há a necessidade crescente de diminuir complicações evitáveis e prevenir os erros. Nesse contexto, insere-se o controle da infecção hospitalar, que está ligado ao nível de qualidade dos serviços oferecidos nos hospitais.

Sobre o exposto, é correto afirmar:

- A) O uso de antimicrobianos como profilaxia deve ser estimulado com vistas a minimizar a ocorrência de resistência bacteriana.
- B) O uso de luvas dispensa a lavagem das mãos antes do contato que envolva mucosas, sangue ou outros fluidos corpóreos, secreções ou excreções.
- C) A higienização das mãos é a medida individual mais simples e menos dispendiosa para prevenir a propagação das infecções relacionadas à saúde.
- D) A instituição de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) é dispensável em hospitais com baixos níveis de infecção hospitalar.

30.(MOVENS - HEMOPA PA - 2007) Com referência à infecção hospitalar, assinale a opção **INCORRETA**.

- A) Condições higiênicas de objetos que estão em contato com o paciente, como lençóis e sondas, são causas de infecção hospitalar.
- B) A lavagem das mãos é uma ação importante para a prevenção e o controle das infecções hospitalares.



C) O emprego de técnicas inadequadas na manipulação e na administração de medicamentos pode ser causa de infecção hospitalar.

D) Radioterapia é um exemplo de terapia que auxilia na prevenção das infecções hospitalares, por aumentar a imunidade do paciente.

Microbiologia da água e dos alimentos

31.(URI - Prof. Pref. Santo Ângelo/RS - 2019) A maioria dos alimentos que fazem parte da dieta humana, excetuando-se os alimentos esterilizados, podem conter microrganismos, incluindo leveduras, bolores e bactérias. A presença desses microrganismos em alimentos não significa necessariamente risco para os consumidores ou uma qualidade inferior dos alimentos; porém é importante conhecer quantos e quais microrganismos estão presentes. Nesse contexto, a análise microbiológica revela-se fundamental para avaliar a condição microbiológica dos alimentos e envolve uma grande diversidade de métodos. Em relação a esse tópico, leia as afirmativas a seguir e assinale a alternativa correta.

I. O método mais indicado para a determinação de populações bacterianas aeróbias totais em alimentos é a Contagem Padrão em Placas, com incubação em jarra de Gaspak.

II. A contagem padrão em placas é um indicativo da possível presença de patógenos ou toxinas microbianas nos alimentos.

III. A contagem total de aeróbios mesófilos em placas utilizando ágar PCA (*Plate Count Agar*) não permite diferenciar tipos de bactérias presentes nos alimentos.

IV. As bactérias lácticas são um grupo de microrganismos que tem como principal característica a fermentação de carboidratos com produção de ácido lático e podem ser quantificadas, em alimentos, através de contagem em placa por semeadura em profundidade e incubação em anaerobiose.

A) Estão corretas somente as afirmativas I, II e III.

B) Estão corretas somente as afirmativas III e IV.

C) Estão corretas somente as afirmativas I e II.

D) Estão corretas somente as afirmativas II, III e IV.

32.(URI - Prof. Pref. Santo Ângelo/RS - 2019) Em um alimento envolvido num surto de DTA, a bactéria detectada como agente causador demonstrou duplicar sua população a cada 30 minutos. Supondo



que a quantidade inicial dessa bactéria no alimento recém elaborado era de 10 UFC/g de alimento, qual seria o número total de microrganismos em 10g do alimento, se ingerido pelos consumidores após 2 horas de sua colocação sobre a mesa?

- A) 160 UFC.
- B) 320 UFC.
- C) 1600 UFC.
- D) 400 UFC.

33.(ADVISE - PREF MOREILÂNDIA/PE) É realizada a pesquisa de coliformes de origem fecal e coliformes totais, na análise bacteriológica de alimentos e água. Por qual motivo?

- A) São bactérias e vírus existentes no solo, em abundância
- B) Causam doenças tais como a cólera e a leptospirose
- C) São parasitas do corpo humano
- D) São bactérias patogênicas
- E) São indicadores de contaminação



QUESTÕES COMENTADAS



Procedimentos laboratoriais

1. (Crescer Consultorias - Prefeitura de Paulistana - 2019 - adaptada) A coloração de Gram é um passo muito importante na caracterização e classificação inicial das bactérias. Esse método de coloração permite que as bactérias sejam visualizadas no microscópio óptico, uma vez que sem a coloração é impossível observá-las ou identificar sua estrutura. O procedimento correto da coloração é:

A) Coloração com violeta de cristal; Adição de mordente (lugol); A descoloração (utilizando etanol/acetona); A contra-coloração (utilizando corante Safranina, vermelho).

B) Cobrir a lâmina com fucsina fenicada, Lavar com água corrente; Cobrir a lâmina com álcool-ácido 3% até descorar totalmente o esfregaço; Lavar com água corrente; Cobrir a lâmina com azul de metileno durante 1 minuto; Lavar com água corrente.

C) Submergir a lâmina de gram a uma solução de triarilmetano a 0,1%, uma solução de xantenos a 0,1% e a uma solução de tiazinas a 0,1%

D) Depositar o corante Azul de Metileno sobre o esfregaço previamente fixado deixando-se corar por 3 a 5 minutos. Em seguida escorre-se o corante, lava-se em água corrente.

Comentários:

O procedimento correto da coloração é:

1. Coloração com cristal violeta (corante primário)
2. Adição de lugol (mordente)
3. Descoloração (utilizando etanol/acetona)
4. A contracoloração (utilizando corante Safranina, vermelho)

Gabarito: alternativa A.



2. (UNIFESP - 2018) A coloração de Gram é uma das principais técnicas para avaliação das características morfológicas das bactérias. Sabendo o princípio e as diferentes etapas desta técnica de coloração, qual seria a consequência caso houvesse uma inversão de ordem das etapas e o técnico em microbiologia submetesse a amostra à solução de álcool a 95% antes de tratar a amostra com lugol?

- A) O álcool pode ser adicionado em qualquer etapa da coloração de Gram; portanto, a troca não altera o resultado final.
- B) O lugol funciona como descorante, retirando o excesso de cristal violeta, deixando todas as bactérias coradas em roxo.
- C) As bactérias Gram-negativas serão coradas pelo cristal violeta.
- D) As bactérias Gram-positivas serão descoradas pela ação do álcool.
- E) O lugol permitirá que as bactérias Gram-negativas apresentem a coloração roxa.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O álcool deve ser adicionado após o lugol e antes do contracorante.

A **alternativa B** está incorreta. O lugol forma um complexo com o cristal violeta, ajudando a fixar o corante nas células Gram-positivas. Ele não atua como descorante. No caso do uso do álcool antes do lugol, não ocorrerá a formação dos complexos, porque o álcool vai remover todo o cristal violeta das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A **alternativa C** está incorreta. Caso se utilize o álcool antes do lugol, todo o corante primário será removido e nenhuma bactéria irá apresentar coloração pelo cristal violeta.

A **alternativa D** está correta e é o gabarito da questão. Exatamente! Como o álcool foi adicionado antes da formação dos complexos de cristal violeta com lugol, o corante primário será removido de todas as células.

A **alternativa E** está incorreta. O lugol não confere coloração roxa, ele apenas forma complexos com o cristal violeta para ajudar a fixá-lo na parede das bactérias Gram-positivas.

3. (IBADE - Pref. Ji-Paraná/RO - 2018) A coloração de Gram é a mais utilizada na rotina de microbiologia clínica. Nessa coloração, as bactérias são expostas ao álcool 95% ou a uma solução de acetona/álcool. A importância desse passo na técnica dessa coloração é:

- A) permite que o corante púrpura seja liberado das células bacterianas, pois causa o rompimento da membrana externa.
- B) facilita a entrada do corante púrpura dentro das células Gram-negativas.
- C) forma um complexo com a solução de iodo presente nesta coloração.



- D) responsável pela adesão das células às lâminas.
E) retém o corante púrpura dentro de todos os tipos bacterianos.

Comentários:

A **alternativa A** está correta e é o gabarito da questão. O álcool 95% ou a solução álcool-acetona funciona como descorante e promove a remoção do cristal violeta das bactérias Gram-negativas.

A **alternativa B** está incorreta. O álcool 95% ou a solução álcool-acetona promove a **remoção** do corante púrpura das células Gram-negativas.

A **alternativa C** está incorreta. A solução de iodo (lugol) forma complexo com o cristal violeta, não com o álcool 95% ou a solução álcool-acetona.

A **alternativa D** está incorreta. A etapa de fixação é realizada antes da coloração de Gram.

A **alternativa E** está incorreta. O corante púrpura é retido apenas nas células Gram-positivas, e a substância que realiza essa função é o lugol.

4. (INSTITUTO AOCP - SES-PE - 2018) A bacterioscopia consiste na avaliação da presença de bactérias em materiais biológicos. A coloração de Gram é uma técnica muito utilizada no laboratório de análises clínicas no setor de microbiologia, para diferenciar os microrganismos com base na composição química e integridade da parede celular, o que permite diferenciá-las em Gram-positivas e Gram-negativas. Das alternativas a seguir, qual apresenta a sequência correta do método de Coloração de Gram?

- A) Cristal de violeta, álcool cetona, lugol, safranina.
B) Cristal de violeta, lugol, álcool cetona, azul de cresil brilhante.
C) Cristal de violeta, álcool cetona, lugol, fucsina.
D) Cristal de violeta, lugol, azul de metileno, fucsina.
E) Cristal de violeta, lugol, álcool cetona, fucsina/safranina.

Comentários:

A sequência correta do método de coloração de Gram é Cristal de violeta, lugol, álcool-acetona, fucsina/safranina.

Gabarito: alternativa E.



5. (UECE - SES-CE - 2006) O laboratório de microbiologia exerce importante papel no controle da infecção hospitalar, orientando os procedimentos corretos quanto à coleta e transporte de amostras biológicas destinadas às culturas no laboratório. Quanto ao material biológico e seu modo, apropriado, de coleta e tempo crítico para entrega ao laboratório, podemos afirmar, corretamente.

- A) O líquido deve ser colhido em tubo seco estéril e, imediatamente após a coleta, ser entregue ao laboratório sob refrigeração.
- B) O líquido pleural deve ser colhido em tubo seco estéril e enviado imediatamente ao laboratório, não podendo ser refrigerado.
- C) O sangue destinado às hemoculturas deve ser colhido com EDTA, podendo ser refrigerado.
- D) Material do trato respiratório deve ser colhido em tubo seco estéril e enviado ao laboratório em até 24 horas.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O líquido deve ser colhido em tubo seco estéril e, imediatamente após a coleta, ser entregue ao laboratório **em temperatura ambiente**.

A **alternativa B** está correta e é o gabarito da questão. O líquido pleural deve ser colhido em tubo seco estéril e enviado imediatamente ao laboratório **em temperatura ambiente**, não podendo ser refrigerado.

A **alternativa C** está incorreta. O sangue destinado às hemoculturas deve ser **passado para caldo nutriente imediatamente após a coleta**, não podendo ser refrigerado.

A **alternativa D** está incorreta. Material do trato respiratório deve ser colhido em tubo seco estéril e enviado ao laboratório em até **30 minutos**.

Meios de cultura e provas de identificação

6. (IBFC - EBSEH - 2020) Analise as afirmativas abaixo e dê valores Verdadeiro (V) ou Falso (F).

- I. () O meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, tais como *Salmonella* e *Shigella*.
- II. () O meio de Thayer-Martin é um meio rico e superior a outros meios de cultivo destinados para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*.
- III. () O meio de Ágar Mac Conkey contém cristal violeta que inibe o crescimento de microrganismos Gram negativos.



IV. () O meio de Ágar sangue permite a verificação de hemólise dos *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*

Assinale a alternativa que apresenta a sequência correta de cima para baixo.

- A) V, V, F, F
- B) F, F, F, F
- C) V, V, V, F
- D) F, F, F, V
- E) F, V, F, V

Comentários:

Vamos analisar cada uma das afirmativas.

I: Falso. O meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, tais como *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella spp.*

II: Verdadeiro. Descrição correta do meio de Thayer-Martin.

III: Falso. O meio de Ágar Mac Conkey contém cristal violeta que inibe o crescimento de microrganismos **Gram positivos**.

IV: Verdadeiro. No meio ágar sangue a conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*

A sequência correta é F, V, F, V.

Gabarito: alternativa E.

7. (VUNESP - EBSERH - 2020) Assinale alternativa que apresenta meios de cultura seletivos.

- A) Agar Salmonella-Shigella (SS), Agar Chocolate e Meio de Löwenstein Jensen.
- B) Agar Salmonella-Shigella (SS), Agar Mueller Hinton e Agar Thayer-Martin chocolate.
- C) Agar chocolate, Agar Thayer-Martin e Agar Mueller Hinton.
- D) Agar Thayer-Martin chocolate, Agar Salmonella-Shigella (SS) e Meio de Löwenstein Jensen.
- E) Agar chocolate, Agar Mueller Hinton e Meio de Löwenstein Jensen.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. **Agar Chocolate** é um meio **enriquecido**.



A **alternativa B** está incorreta. **Agar Mueller Hinton** é o meio utilizado para realização do **antibiograma**.

A **alternativa C** está incorreta. **Agar Chocolate** é um meio **enriquecido** e **Agar Mueller Hinton** é o meio utilizado para realização do **antibiograma**.

A **alternativa D** está correta e é o gabarito da questão. Agar Thayer-Martin chocolate, Agar Salmonella-Shigella (SS) e Meio de Löwenstein Jensen são considerados meios de cultura seletivos, pois **inibem o crescimento de alguns microrganismos enquanto permitem o crescimento de outros**.

A **alternativa E** está incorreta. **Agar Chocolate** é um meio **enriquecido** e **Agar Mueller Hinton** é o meio utilizado para realização do **antibiograma**.

8. (ADVISE - Pref. Juarez Tavorá/PB - 2019) Os meios de cultivo devem conter as substâncias exigidas pelas bactérias para o seu crescimento e multiplicação. Para que possam fazer a síntese de sua própria matéria nutritiva devem dispor de fontes de carbono (proteínas, açúcares), fontes de nitrogênio (peptonas) e fontes de energia. São também necessários alguns sais inorgânicos, vitaminas e outras substâncias favorecedoras do crescimento. Classificação dos meios de cultivo quanto à consistência:

I- Meios líquidos: são aqueles em que os nutrientes estão dissolvidos em uma solução aquosa. O crescimento bacteriano nesse meio muda seu aspecto, ou seja o meio sofre uma turvação;

II- Meios semissólidos: são aqueles que possuem na sua composição, além dos nutrientes, uma pequena porcentagem de um polissacarídeo proveniente de algas marinhas, chamado ágar. São geralmente utilizados em tubos e a partir desse tipo de cultura é possível observar a motilidade bacteriana;

III- Meios sólidos: são aqueles que possuem uma porcentagem maior de ágar (cerca de 15 g/litro de água destilada), além dos nutrientes. Podem ser dispostos em tubos ou em Placas de Petri, dependendo da finalidade. Através do meio sólido em placas de Petri é possível, utilizando-se a técnica do esgotamento, conseguir o isolamento de colônias bacterianas e, portanto, é o meio ideal para que seja feito o estudo da morfologia colonial.

Dos itens acima:

- A) Apenas o item I está correto.
- B) Apenas os itens I e II estão corretos.
- C) Apenas os itens I e III estão corretos.
- D) Apenas os itens II e III estão corretos.
- E) Todos os itens estão corretos.



Comentários:

As três afirmativas apresentam descrições corretas dos três tipos de meios de cultura (líquidos, semissólidos e sólidos).

Gabarito: alternativa E.

9. (COVEST-COPSET - UFPE - 2019) Nos meios de cultura ditos diferenciais ou indicadores, a coloração das colônias sofre interferência das reações que, em algumas espécies bacterianas, ocorrem com o substrato do meio. Deste modo, é possível identificar algumas espécies pelas características que apresentam suas colônias. Nos meios abaixo sinalizados, associe o aspecto das colônias, indicado na coluna da esquerda, com a espécie bacteriana mais provável, indicada na coluna da direita.

- a. Agar Mac Conckey Colônias vermelhas
- b. Agar eosina azul de metileno Colônia com brilho verde metálico
- c. Agar sangue 5% Colônia com β hemólise
- d. Agar S-S Colônias incolores / róseas com centro negro

- 1) Salmonella typhimurium
- 2) Streptococcus grupo A
- 3) Bacilos Gram negativo-Lactose +
- 4) Escherichia coli

A alternativa que indica a combinação correta é:

- A) a-4; b-2 c-1 ; d-3
- B) a-1 ; b-2; c-3; d-4
- C) a-3; b-4; c-2; d-1
- D) a-2; b-1; c-3; d-4
- E) a-4; b-3; c-2; d-1

Comentários:

a. Agar Mac Conckey Colônias vermelhas: 3) Bacilos Gram negativos-Lactose +



- b. Agar eosina azul de metileno Colônia com brilho verde metálico: 4) *Escherichia coli*
- c. Agar sangue 5% Colônia com β hemólise: 2) *Streptococcus* grupo A
- d. Agar S-S Colônias incolores / róseas com centro negro: 1) *Salmonella typhimurium*

A combinação correta é a-3; b-4; c-2; d-1.

Gabarito: alternativa C.

10. (COVEST-COPSET - UFPE - 2019) Os meios de cultura podem ser classificados segundo seus objetivos funcionais ou sua composição. Observe os enunciados abaixo e assinale aquele que está correto.

- A) Meios enriquecidos são aqueles cujos componentes viabilizam a conservação dos microrganismos no laboratório.
- B) Meios seletivos permitem a separação de colônias de microrganismos através de reagentes indicadores.
- C) Meios diferenciais contêm nutrientes que inibem o crescimento de algumas espécies de microrganismos, permitindo o crescimento de outras.
- D) Meios de transporte têm composição nutritiva que garante a sobrevivência e carece de fontes de nitrogênio, impedindo a multiplicação dos microrganismos
- E) Meios nutritivos possuem quantidades de nutrientes suficientes para cultivar qualquer bactéria.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. A descrição se refere aos meios de conservação.

A **alternativa B** está incorreta. A descrição se refere aos meios diferenciais ou indicadores.

A **alternativa C** está incorreta. A descrição se refere aos meios seletivos.

A **alternativa D** está correta e é o gabarito da questão. É exatamente essa a definição de um meio de transporte.

A **alternativa E** está incorreta. Um meio nutritivo é aquele que apresenta uma combinação de sais minerais, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento.

11. (COVEST-COPSET - UFPE - 2019) No tratamento de amostra biológica, para exame bacteriológico, é fundamental fornecer os nutrientes adequados para as possíveis bactérias contidas na amostra.



Associe os meios de cultura indicados na coluna da esquerda com as bactérias patogênicas (coluna da direita) que provavelmente serão favorecidas no crescimento.

MEIOS DE CULTURA	BACTÉRIAS
a. Ágar chocolate	1 - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
b. Meio de Lowenstein Jensen	2 - <i>Neisseria meningitidis</i>
c. Meio de Thayer Martin	3 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
d. Meio de Mac Conkey	4 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
e. Meio de Loeffler	5 - <i>Klebsiella pneumoniae</i>

A alternativa que indica a combinação correta é:

- A) a-2; b-4; c-1; d-5 e-3
- B) a-3; b-5; c-4; d-2; e-1
- C) a-5; b-2; c-3; d-4; e-1
- D) a-4; b-1; c-5; d-3 e-2
- E) a-1 ; b-3; c-4; d-2; e-5

Comentários:

- a. Ágar chocolate: 2 - *Neisseria meningitidis*
- b. Meio de Lowenstein Jensen: 4 - *Mycobacterium tuberculosis*
- c. Meio de Thayer Martin: 1 - *Neisseria gonorrhoeae*
- d. Meio de Mac Conkey: 5 - *Klebsiella pneumoniae*
- e. Meio de Loeffler: 3 - *Corynebacterium diphtheriae*

A combinação correta é a-2; b-4; c-1; d-5 e-3.

Gabarito: alternativa A.

12.(Crescer Consultorias - Prefeitura de Paulistana - 2019) Com relação à escolha de meios de cultura seletivos em relação ao agente está INCORRETO:

- A) *Corynebacterium diphtheriae* - Ágar cistinatelurito.
- B) *Legionella spp* - Ágar carvão-extrato de levedura tamponado.
- C) *Vibrio spp* - Ágar sangue Bordet-Gengou.
- D) *Neisseria* - Thayer Martin.

Comentários:



Conforme estudamos, os meios específicos de acordo com o agente são:

Agente	Meio específico de acordo com manuais de fabricantes
<i>Bordetella pertussis</i>	Ágar sangue Bordet-Gengou
<i>Brucella spp.</i>	Brucella ágar
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campylobacter ágar
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Ágar cistina-telurito
<i>Legionella spp.</i>	Ágar carvão-extrato de levedura tamponado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ágar Listeria McBride
<i>Mycoplasma/ureaplasma</i>	Transporte: Meio B10 Shepard / Cultura: Meio A7 Shepard
<i>Neisseria</i>	Thayer Martin
<i>Neisseria meningitidis</i>	Thayer Martin
<i>Vibrio spp.</i>	TCBS
Obs: existem meios cromogênicos específicos para diferentes patógenos	<i>Salmonella spp.</i> e <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> O 157. Para algumas espécies de <i>Candida</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , etc.

A única alternativa que está INCORRETA é: *Vibrio spp.* - Ágar sangue Bordet-Gengou, pois o meio indicado para *Vibrio spp.* é o TCBS. O Ágar sangue Bordet-Gengou é indicado para o isolamento de *Bordetella pertussis*.

Gabarito: alternativa C.

13.(COSEAC - UFF - 2019) O procedimento de identificação do microrganismo *Salmonella spp.* preconiza a caracterização de colônias incolores ou transparentes (lactose negativas) quando cultivadas no meio:

- A) caldo tetrationato.
- B) caldo Selenito.
- C) ágar Skirrow.
- D) ágar MacConkey.
- E) ágar Manitol Salgado.

Comentários:

A *Salmonella spp.* forma colônias incolores transparentes no **ágar MacConkey**, o que significa um resultado negativo para a fermentação da lactose. Resultados positivos são expressos na forma de colônias avermelhadas ou rosadas.

Gabarito: alternativa D.



14.(Fundação Aroeira - Pref. Palminópolis/GO - 2018) Os meios de cultura são composições de substâncias que fornecem nutrientes necessários para o crescimento de determinados microrganismos, sendo utilizados para realização dos exames laboratoriais microbiológicos. Ressalta-se que existem também os meios de cultura próprios para transporte e conservação de material biológico. Qual o meio de cultura adequado para transportar e conservar o material biológico, antes de sua inoculação para a realização de exames laboratoriais microbiológicos?

- A) Caldo Tioglicolato.
- B) Ágar chocolate.
- C) Ágar sangue.
- D) Cary Blair.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O caldo Tioglicolato é um meio enriquecido.

A **alternativa B** está incorreta. Ágar chocolate é um meio enriquecido.

A **alternativa C** está incorreta. Ágar sangue é um meio enriquecido.

A **alternativa D** está correta e é o gabarito da questão. Cary Blair é um meio de transporte e conservação.

15.(IADES - SES-DF - 2014) O meio de ágar chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, embora cresçam nesse meio quase todos os tipos de microrganismos. A respeito desse meio de cultura, assinale a alternativa correta.

- A) Não é recomendada a utilização da base de BHI Ágar por apresentar crescimento deficiente de cepas exigentes.
- B) À base do meio deve ser adicionado sangue de frango, peru ou codorna desfibrinado.
- C) O meio deve ser levado a banho-maria a 85 °C, por 15 minutos, para que as hemácias lisem e liberem hemina e hematina.
- D) Deve ser conservado entre -4 °C e -10 °C por três meses (tubos) e um mês (placas).
- E) A coloração original do meio é verde.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. **É recomendada** a utilização da base de BHI Ágar por apresentar **melhor crescimento** de cepas exigentes.



A **alternativa B** está incorreta. À base do meio deve ser adicionado sangue de **cavalo, carneiro ou coelho**.

A **alternativa C** está correta e é o gabarito da questão. O meio é "achocolatado" em **banho-maria por 15 minutos na temperatura de 80-85°C**. Neste processo, ocorre a lise das hemácias e consequente **liberação de hemina e hematina**, que são compostos que favorecem o crescimento dos microrganismos exigentes.

A **alternativa D** está incorreta. Deve ser conservado entre **4°C e 10°C (não é -4°C e -10°C)** por três meses (tubos) e um mês (placas).

A **alternativa E** está incorreta. A coloração original do meio é **castanho escuro (chocolate)**.

16. (IADES - SES-DF - 2014) Acerca do meio de cultura que é rico e superior a outros meios e utilizado para o isolamento de bactérias da família Neisseriaceae, assinale a alternativa correta.

- A) Ágar Mueller Hinton.
- B) Ágar Thayer Martin.
- C) Ágar MacConkey.
- D) Ágar Sangue.
- E) Ágar Cled.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O **Ágar Müller-Hinton** é o meio mais utilizado para realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos.

A **alternativa B** está correta e é o gabarito da questão. O **Ágar Thayer-Martin** é usado para **selecionar *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae***. A adição de colistina, vancomicina e nistatina inibe crescimento de enterobactérias, bactérias Gram-positivas, fungos e algumas espécies de *Neisserias* saprófitas.

A **alternativa C** está incorreta. O **Ágar MacConkey (MC)** contém sais biliares e cristal violeta, **que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas** (estafilococos e enterococos) e **permitem o crescimento de bactérias Gram-negativas** (enterobactérias e não fermentadores).

A **alternativa D** está incorreta. O **Ágar sangue** contém sangue cardíaco bovino e é usado para identificar microrganismos causadores dos diferentes tipos de hemólise (**hemólise α , β e γ**).

A **alternativa E** está incorreta. O **Ágar CLED (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*)** é um meio originalmente azul claro usado no isolamento e na **quantificação de microrganismos** (Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras) em **amostras de urina**.



17.(IADES - SES-DF - 2014) Assinale a alternativa que indica finalidade do ágar eosina azul de metileno (EMB).

- A) Meio seletivo, que inibe o crescimento dos coliformes fecais.
- B) Meio seletivo, usado para o isolamento e a identificação de estafilococos patogênicos.
- C) Meio não seletivo, ideal para ser utilizado em urocultura.
- D) Meio altamente nutritivo, onde crescem vários patógenos.
- E) Meio diferencial, utilizado no isolamento de enterobactérias.

Comentários:

O **Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB)** é um **meio seletivo para coliformes (enterobactérias)** e **diferencial para a fermentação de lactose**.

Gabarito: alternativa E.

18.(IADES - SES-DF - 2014) O meio de cultura Ágar S.S. é considerado adequado para o microrganismo

- A) *Salmonella-Shigella*.
- B) bacilos diftéricos.
- C) bacilo de Koch.
- D) *Vibrio cholerae*.
- E) pneumococos.

Comentários:

O **Ágar *Salmonella-Shigella* (SS)** é um **meio seletivo para *Salmonella* e *Shigella*** e **diferencial para a utilização de lactose** (coloração rósea) e **produção de H₂S** (coloração negra).

Gabarito: alternativa A.

19.(NUCEPE/UESPI - FMS - 2011) Um farmacêutico, ao realizar uma cultura de secreções, isolou uma colônia de estafilococo, considerando que a próxima etapa é a identificação se a cepa é ou não *S. aureus*. A prova bioquímica de identificação presuntiva desta espécie é:

- A) catalase;
- B) coagulase;
- C) bacitracina;



- D) novobiocina;
- E) penicilinase.

Comentários:

A **prova da coagulase** divide os estafilococos em dois grupos: ***Staphylococcus aureus* (coagulase positivo)** e ***Staphylococcus coagulase negativos***.

Gabarito alternativa B.

Semeadura de materiais biológicos

20.(IADES - SES-DF - 2018) A pesquisa de bactérias e fungos no sangue é feita por meio da hemocultura. A esse respeito, assinale a alternativa correta.

- A) O método de coleta do sangue e o volume coletado não influenciam diretamente no resultado desse exame.
- B) A troca de agulhas entre a punção de coleta e a distribuição do sangue no frasco de hemocultura é recomendável.
- C) O volume ideal de sangue inoculado no meio de cultura deve corresponder a 10% do volume total do frasco de coleta.
- D) As punções arteriais são mais eficazes na recuperação dos microrganismos quando comparadas com punções venosas.
- E) A coleta através de cateteres ou cânulas deve prevalecer em relação à punção venosa.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O método de coleta do sangue e o volume coletado influenciam diretamente no resultado desse exame.

A **alternativa B** está incorreta. A Anvisa não recomenda a troca de agulhas entre a coleta e a distribuição do sangue nos frascos específicos.

A **alternativa C** está correta e é o gabarito da questão. De acordo com recomendações da Anvisa, o volume ideal de sangue corresponde a 10% do meio de cultura do frasco.

A **alternativa D** está incorreta. Segundo a Anvisa, punções arteriais não trazem benefícios na recuperação dos microrganismos.



A **alternativa E** está incorreta. De acordo com a Anvisa, a técnica de coleta de sangue através de cateteres deve ser utilizada somente para o diagnóstico de infecções relacionadas ao dispositivo e deverá sempre ser acompanhada de uma amostra de sangue periférico.

21.(IADES - SES-DF - 2014) Acerca da coprocultura, é correto afirmar que

- A) esse tipo de procedimento é feito para a pesquisa de helmintos e protozoários nas fezes.
- B) o paciente, para a coleta do material, deve fazer uso de laxantes.
- C) a amostra, após a coleta, deve ser transportada em recipiente adequado, contendo meio Cary Blair.
- D) é indispensável para identificar agentes patogênicos causadores da tuberculose.
- E) o material a ser coletado é o escarro do paciente, obtido diretamente dos brônquios.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. A coprocultura é realizada para a pesquisa de **bactérias** nas fezes, principalmente as causadoras de gastroenterites.

A **alternativa B** está incorreta. Para a coleta do material, o paciente **não deve** fazer uso de laxantes.

A **alternativa C** está correta e é o gabarito da questão. O meio **Cary Blair** é utilizado no **transporte de material fecal**.

A **alternativa D** está incorreta. Apesar de se poder realizar uma cultura para micobactérias em amostra de fezes, a amostra de escolha para o diagnóstico da tuberculose é o **escarro**.

A **alternativa E** está incorreta. O material a ser coletado são as fezes do **paciente**.

22.(UECE - SES-CE - 2006) Marque o material para o qual há necessidade de semear em caldo selenito.

- A) Líquido pleural.
- B) Urina.
- C) Fezes.
- D) Escarro.

Comentários:

A amostra de **fezes** pode ser semeada em caldo enriquecedor do tipo **Selenito, Tetrationato**, etc

Gabarito alternativa C.



Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

23. (Itame - Prefeitura de Edéia - GO - 2020) Marque o meio de cultura usado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antimicrobianos para as bactérias aeróbicas.

- A) Caldo Verde Brilhante
- B) Extrato de Malte
- C) Ágar Mueller Hinton
- D) Agar Nutriente

Comentários:

Conforme estudamos, o meio de cultura empregado no teste de sensibilidade a antimicrobianos é o **Ágar Mueller Hinton**.

Gabarito: alternativa C.

24. (COPESE - Prefeitura de Palmas - 2013) A respeito do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) utilizando discos de difusão, marque a alternativa CORRETA.

- A) O diâmetro dos halos de inibição de cada disco deve ser medido para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado.
- B) É indicativo de sensibilidade da bactéria ao antimicrobiano testado a presença de um halo de inibição, independente do diâmetro que este possui.
- C) Quando o tamanho do halo de inibição é igual para dois antimicrobianos diferentes em uma mesma cultura de bactérias significa obrigatoriamente que a cepa em questão possui sensibilidade idêntica aos dois fármacos.
- D) A concentração do antibiótico embebido no disco de papel é a mesma para os diferentes antimicrobianos testados.

Comentários:

A **alternativa A** está correta e é o gabarito da questão. No teste de sensibilidade a antimicrobianos, o antibiótico difunde-se na área ao redor de cada disco e um halo de inibição (evidenciando lise bacteriana) se formará ao redor do disco se o microrganismo for sensível ao antibiótico. Este halo deve ser medido em milímetros para determinar se o microrganismo é sensível, intermediário ou resistente a cada antimicrobiano.



A **alternativa B** está incorreta. Existe um **diâmetro pré-definido** para os halos de inibição para se considerar se o microrganismo é sensível a cada antimicrobiano.

A **alternativa C** está incorreta. **Para cada antimicrobiano** existe um diâmetro pré-estabelecido para avaliar a sensibilidade dos microrganismos.

A **alternativa D** está incorreta. A concentração do antibiótico embebido no disco de papel é **variável** conforme o antimicrobiano testado.

Diagnóstico de infecções

25.(MSCONCURSOS - Pref. Jequié/BA - 2018) Menina com 3 anos de idade apresentava-se febril e estava com perda de apetite nas últimas 24 horas, e havia a dificuldade de acordá-la nas últimas 2 horas. A criança tem um histórico de desenvolvimento normal desde o nascimento. Apresenta-se com um histórico clínico bem semelhante ao de várias crianças que frequentam a mesma creche que ela. As imunizações estavam em dia. Um exame físico importante revelou que, ao seu pescoço ser fletido passivamente, ocorreu também flexão das pernas (sinal de Brudzinski positivo, sugerindo irritação nas meninges).

Analizando o caso clínico acima, qual das alternativas abaixo **NÃO** representa um achado laboratorial que poderia diagnosticar a doença?

- A) Na coloração de gram, constatou-se a presença de diplococos gram-negativos sugestivos de *Neisseria meningitidis*.
- B) Líquido cerebrospinal límpido.
- C) Leucocitose.
- D) Hipoglicorraquia.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. A presença de diplococos Gram-negativos sugestivos de *Neisseria meningitidis* é condizente com o diagnóstico de meningite.

A **alternativa B** está correta e é o gabarito da questão. Em casos de meningite, o líquido se apresenta **turvo**.

A **alternativa C** está incorreta. A leucocitose é um achado condizente com a meningite.

A **alternativa D** está incorreta. Em casos de meningite bacteriana ocorre a hipoglicorraquia (baixos níveis de glicose no líquido), pois as bactérias presentes no LCR consomem a glicose.



26.(IBADE - Pref. Ji-Paraná/RO - 2018) Dos microrganismos a seguir qual é o mais frequentemente encontrado nas faringites?

- A) *Chlamydia trachomatis*
- B) *Haemophilus influenzae*
- C) *Rickettsia sp*
- D) *Staphylococcus aureus*
- E) *Streptococcus pyogenes*

Comentários:

O microrganismo mais frequentemente encontrado nas faringites é o *Streptococcus pyogenes*.

Gabarito: alternativa E.

Controle da infecção hospitalar

27.(FUNDAÇÃO AROEIRA -PREF TAQUARAL DE GOIÁS/GO - 2019) Avalie os itens relacionados aos critérios de definição das infecções hospitalares (IH).

I - As infecções que acometem recém-nascidos transmitidas de forma transplacentária são definidas como IH.

II - IH são infecções adquiridas após a admissão do paciente e se manifestam exclusivamente após a alta, estando relacionada aos procedimentos hospitalares.

III - A IH pode manifestar-se antes de 72 horas de internação, quando associada a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados no hospital, durante esse período.

IV - É considerada IH quando se desconhece o período de incubação do microrganismo e não há evidência clínica e/ou laboratorial de infecção no momento da internação. A manifestação clínica se apresenta a partir de 72 horas após a admissão do paciente.

Assinale a única alternativa que apresenta o(s) item(ns) correto(s).

- A) IV, apenas.
- B) I e III, apenas.
- C) I e IV, apenas.
- D) III e IV, apenas.

Comentários:



Vamos analisar cada afirmativa separadamente:

I: incorreta. Como é possível verificar na Portaria nº 2616/98, os casos de infecções em recém-nascidos quando adquiridos de forma transplacentária **não são consideradas infecções hospitalares**, visto que nestes casos elas foram passadas pela mãe.

II: incorreta. As infecções hospitalares **podem se manifestar também durante o período de internação** e não exclusivamente após a alta do paciente.

III: correta. De acordo com a Portaria 2616/98, podem ser consideradas infecções hospitalares aquelas que se manifestarem **antes de 72 horas da admissão do paciente desde que seja possível associar o quadro infeccioso com procedimentos médicos** que tenham sido realizados neste período de tempo.

IV: correta. Também de acordo com a Portaria 2616/98, nos casos em que o **período de incubação é desconhecido** e quando o paciente deu entrada no hospital sem o quadro infeccioso, pode-se considerar infecção hospitalar as manifestações infecciosas que aparecerem **após 72 horas da admissão do paciente**.

Logo, estão corretos os itens **III e IV, apenas**.

Gabarito alternativa D.

28.(FAUEL - PREF CERRO AZUL/PR - 2016) De acordo com a Portaria Nº 2616/98, os Conceitos e Critérios diagnósticos das Infecções Hospitalares são:

I. Infecção comunitária - é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital.

II. Infecção comunitária - a infecção que está associada com complicação ou extensão da infecção já presente na admissão, a menos que haja troca de microrganismos com sinais ou sintomas fortemente sugestivos da aquisição de nova infecção.

III. Infecção comunitária - a infecção em recém-nascido, cuja aquisição por via transplacentária é conhecida ou foi comprovada e que se tornou evidente logo após o nascimento, como por exemplo: herpes simples, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose, sífilis e AIDS.

IV. Infecção hospitalar - é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

V. Infecção hospitalar - é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital.

A) Todas as afirmações estão corretas.



- B) Apenas a afirmação V está incorreta.
- C) Apenas a afirmação I está incorreta.
- D) As afirmações I e III estão incorretas.

Comentários:

I: correta. De acordo com a Portaria 2616/98 infecção comunitária "é aquela constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital". Ou seja, são os quadros de infecção adquiridos na comunidade e não no ambiente hospitalar.

II: correta. Segundo o que diz a Portaria 2616/98, os casos de complicação ou extensão de uma infecção já existente no momento da admissão do paciente no hospital são considerados infecção comunitária, desde que não haja indícios de que o paciente possa ter adquirido uma nova infecção dentro do ambiente hospitalar após a sua admissão.

III: correta. Os casos de infecção em recém-nascidos em que for identificado que houve infecção transplacentária (transmissão da mãe para o bebê) são considerados infecção comunitária. As doenças citadas na afirmativa são exemplos de infecções que ocorrem por via transplacentária.

IV: correta. A Portaria 2616/98 define infecção hospitalar como: "aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares".

V: incorreta. A afirmação refere-se à definição de **infecção comunitária** encontrada na Portaria 2616/98, e não de infecção hospitalar.

Gabarito: alternativa B.

29.(COMPERVE - PREF DE BOA SAÚDE/RN - 2014) Atualmente, a segurança do paciente é uma das questões mais críticas para a Saúde. Há a necessidade crescente de diminuir complicações evitáveis e prevenir os erros. Nesse contexto, insere-se o controle da infecção hospitalar, que está ligado ao nível de qualidade dos serviços oferecidos nos hospitais.

Sobre o exposto, é correto afirmar:

- A) O uso de antimicrobianos como profilaxia deve ser estimulado com vistas a minimizar a ocorrência de resistência bacteriana.
- B) O uso de luvas dispensa a lavagem das mãos antes do contato que envolva mucosas, sangue ou outros fluidos corpóreos, secreções ou excreções.
- C) A higienização das mãos é a medida individual mais simples e menos dispendiosa para prevenir a propagação das infecções relacionadas à saúde.



D) A instituição de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) é dispensável em hospitais com baixos níveis de infecção hospitalar.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O uso amplo de antimicrobianos **umenta as chances de casos de resistência bacteriana** pois seleciona as bactérias resistentes. O correto é que a utilização destes fármacos seja realizada de forma mais criteriosa.

A **alternativa B** está incorreta. De acordo com a Portaria 2616/98 **o uso de luvas não dispensa a higienização das mãos**, em especial quando há contato com mucosas, sangue, fluidos corporais, secreções ou excreções.

A **alternativa C** está correta e é o gabarito da questão. A lavagem correta das mãos é sim considerada a medida individual mais simples e menos dispendiosa no controle das infecções hospitalares, sendo altamente necessária e recomendada dentro dos ambientes hospitalares.

A **alternativa D** está incorreta. A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) **não é dispensável**, todos os hospitais devem instituir a sua CCIH de acordo com os critérios estabelecidos na Portaria 2616/98.

30.(MOVENS - HEMOPA PA - 2007) Com referência à infecção hospitalar, assinale a opção INCORRETA.

A) Condições higiênicas de objetos que estão em contato com o paciente, como lençóis e sondas, são causas de infecção hospitalar.

B) A lavagem das mãos é uma ação importante para a prevenção e o controle das infecções hospitalares.

C) O emprego de técnicas inadequadas na manipulação e na administração de medicamentos pode ser causa de infecção hospitalar.

D) Radioterapia é um exemplo de terapia que auxilia na prevenção das infecções hospitalares, por aumentar a imunidade do paciente.

Comentários:

A **alternativa A** está correta. Os objetos que estão próximos ou em contato com o paciente também podem ser fontes de contaminação e dar origem a quadros de infecção hospitalar, por isso devem ser devidamente higienizados ou esterilizados, quando for o caso.

A **alternativa B** está correta. Sim, a higienização correta das mãos é considerada a principal medida individual de controle a infecção hospitalar, é também a medida mais simples e menos dispendiosa, sendo altamente recomendada não só para os profissionais de saúde, mas também para os pacientes e visitantes.

A **alternativa C** está correta. Sim, o uso inadequado ou elevado de antimicrobianos aumenta o aparecimento de bactérias resistentes no meio hospitalar, essas bactérias são uma importante e preocupante causa de infecção hospitalar.



A **alternativa D** está INCORRETA e é o gabarito da questão. A radioterapia **não aumenta a imunidade do paciente**, pelo contrário, pode muitas vezes deixá-lo mais vulnerável, portanto, não é um tratamento que previne infecções hospitalares.

Microbiologia da água e dos alimentos

31.(URI - Pref. Pref. Santo Ângelo/RS - 2019) A maioria dos alimentos que fazem parte da dieta humana, excetuando-se os alimentos esterilizados, podem conter microrganismos, incluindo leveduras, bolores e bactérias. A presença desses microrganismos em alimentos não significa necessariamente risco para os consumidores ou uma qualidade inferior dos alimentos; porém é importante conhecer quantos e quais microrganismos estão presentes. Nesse contexto, a análise microbiológica revela-se fundamental para avaliar a condição microbiológica dos alimentos e envolve uma grande diversidade de métodos. Em relação a esse tópico, leia as afirmativas a seguir e assinale a alternativa correta.

I. O método mais indicado para a determinação de populações bacterianas aeróbias totais em alimentos é a Contagem Padrão em Placas, com incubação em jarra de Gaspak.

II. A contagem padrão em placas é um indicativo da possível presença de patógenos ou toxinas microbianas nos alimentos.

III. A contagem total de aeróbios mesófilos em placas utilizando ágar PCA (*Plate Count Agar*) não permite diferenciar tipos de bactérias presentes nos alimentos.

IV. As bactérias lácticas são um grupo de microrganismos que tem como principal característica a fermentação de carboidratos com produção de ácido lático e podem ser quantificadas, em alimentos, através de contagem em placa por semeadura em profundidade e incubação em anaerobiose.

- A) Estão corretas somente as afirmativas I, II e III.
- B) Estão corretas somente as afirmativas III e IV.
- C) Estão corretas somente as afirmativas I e II.
- D) Estão corretas somente as afirmativas II, III e IV.

Comentários:

I: incorreta. A jarra de Gaspak é também conhecida como "**jarra anaeróbia**", sua função é criar um **ambiente anaeróbico**, portanto, não poderia ser utilizada para crescimento de microrganismos aeróbios.



II: incorreta. A contagem em placas é um método de análise quantitativa de microrganismos, ou seja, é utilizada para determinar a **quantidade de microrganismos presentes na amostra**. Este método não se relaciona com a determinação ou indicação de **microrganismos patogênicos ou toxinas**.

III: correta. O meio ágar padrão para contagem (PCA) é utilizado apenas para contagem total das colônias, mas não é um meio específico que possibilite uma diferenciação entre os tipos de microrganismos.

IV: correta. As bactérias lácticas são um grupo de bactérias caracterizadas principalmente por fermentarem carboidratos e por terem o ácido láctico como principal produto do seu metabolismo. A semeadura em profundidade (*Pour Plate*) e a incubação anaeróbia são métodos utilizados para contagem destas bactérias.

Logo, estão corretas somente as **afirmativas III e IV**.

Gabarito: alternativa B.

32.(URI - Pref. Pref. Santo Ângelo/RS - 2019) Em um alimento envolvido num surto de DTA, a bactéria detectada como agente causador demonstrou duplicar sua população a cada 30 minutos. Supondo que a quantidade inicial dessa bactéria no alimento recém elaborado era de 10 UFC/g de alimento, qual seria o número total de microrganismos em 10g do alimento, se ingerido pelos consumidores após 2 horas de sua colocação sobre a mesa?

- A) 160 UFC.
- B) 320 UFC.
- C) 1600 UFC.
- D) 400 UFC.

Comentários:

Com base no enunciado, sabemos que a quantidade inicial da bactéria no alimento era de 10 UFC/g. Se a população bacteriana duplica a cada 30 minutos, para sabermos a quantidade após o período de 2 horas podemos seguir o seguinte raciocínio:

Tempo	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min. (2h)
Quantidade de bactérias	10 UFC/g	20 UFC/g	40 UFC/g	80 UFC/g	160 UFC/g

De acordo com o raciocínio mostrado na tabela acima, sabemos que após 2 horas cada grama de alimento irá conter 160 UFC. Portanto, para saber a quantidade de bactérias em 10 gramas de alimento, basta multiplicar este valor por 10, assim temos:

$$160 \times 10 = 1600 \text{ UFC.}$$

Logo, após 2 horas, 10 gramas do alimento irão conter **1600 UFC**.



Gabarito: alternativa C.

33.(ADVISE - PREF MOREILÂNDIA/PE) É realizada a pesquisa de coliformes de origem fecal e coliformes totais, na análise bacteriológica de alimentos e água. Por qual motivo?

- A) São bactérias e vírus existentes no solo, em abundância
- B) Causam doenças tais como a cólera e a leptospirose
- C) São parasitas do corpo humano
- D) São bactérias patogênicas
- E) São indicadores de contaminação

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. Os coliformes são um grupo de bactérias apenas, não de vírus.

A **alternativa B** está incorreta. As bactérias do grupo coliforme são representadas pelos gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. As bactérias causadoras da cólera e da leptospirose não se enquadram neste grupo.

A **alternativa C** está incorreta. Algumas bactérias do grupo coliforme habitam o trato gastrointestinal de alguns animais e também do homem, mas isso não é válido para todo o grupo.

A **alternativa D** está incorreta. Nem todas as bactérias presentes no grupo de coliformes são patogênicas, inclusive muitas habitam naturalmente o trato gastrointestinal do homem.

A **alternativa E** está correta e é o gabarito da questão. O principal motivo da pesquisa de coliformes em água e em alimentos é que as bactérias deste grupo servem como indicadores de contaminação e de baixas condições de higiene.



GABARITO



GABARITO

1. A
2. D
3. A
4. E
5. B
6. E
7. D
8. E
9. C
10. D
11. A

12. C
13. D
14. D
15. C
16. B
17. E
18. A
19. B
20. C
21. C
22. C

23. C
24. A
25. B
26. E
27. D
28. B
29. C
30. D
31. B
32. C
33. E



REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica. Brasília: Anvisa, 2013. 44p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 2: Controle Externo da Qualidade. Brasília: Anvisa, 2013. 42p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas. Brasília: Anvisa, 2013. 150.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final. Brasília: Anvisa, 2013. 95p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Brasília: Anvisa, 2013. 95p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília: Anvisa, 2013. 150p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica. Brasília: Anvisa, 2013. 43p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. Brasília: Anvisa, 2013. 46p.



BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 9: Infecções virais. Brasília: Anvisa, 2013. 150p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº. 173, de 13 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e de Água Natural e a Lista de Verificação das Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e de Água Natural. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/rdc0173_13_09_2006.html>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>.

EBSERH. Procedimento Operacional Padrão - POP/CCIH/007/2016. Procedimento de coleta de material para cultura. Disponível em: <<http://www2.ebserh.gov.br/documents/220250/1649711/PROCEDIMENTO+DE+COLETA+DE+MATERIAL+PARA+CULTURA.pdf/96a17a54-fbdb-4820-9c8d-7db3d33fb595>>.

HOLANDA, Cecília Maria de Carvalho Xavier; ARIMATEIA, Dayse Santos; MOTTA NETO, Renato. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos. Natal, RN: EDUFRRN, 2017. 134 p.



ESSA LEI TODO MUNDO CONHECE: PIRATARIA É CRIME.

Mas é sempre bom revisar o porquê e como você pode ser prejudicado com essa prática.



1 Professor investe seu tempo para elaborar os cursos e o site os coloca à venda.



2 Pirata divulga ilicitamente (grupos de rateio), utilizando-se do anonimato, nomes falsos ou laranjas (geralmente o pirata se anuncia como formador de "grupos solidários" de rateio que não visam lucro).



3 Pirata cria alunos fake praticando falsidade ideológica, comprando cursos do site em nome de pessoas aleatórias (usando nome, CPF, endereço e telefone de terceiros sem autorização).



4 Pirata compra, muitas vezes, clonando cartões de crédito (por vezes o sistema anti-fraude não consegue identificar o golpe a tempo).



5 Pirata fere os Termos de Uso, adultera as aulas e retira a identificação dos arquivos PDF (justamente porque a atividade é ilegal e ele não quer que seus fakes sejam identificados).



6 Pirata revende as aulas protegidas por direitos autorais, praticando concorrência desleal e em flagrante desrespeito à Lei de Direitos Autorais (Lei 9.610/98).



7 Concurseiro(a) desinformado participa de rateio, achando que nada disso está acontecendo e esperando se tornar servidor público para exigir o cumprimento das leis.



8 O professor que elaborou o curso não ganha nada, o site não recebe nada, e a pessoa que praticou todos os ilícitos anteriores (pirata) fica com o lucro.



Deixando de lado esse mar de sujeira, aproveitamos para agradecer a todos que adquirem os cursos honestamente e permitem que o site continue existindo.