Estratégia Concursos

Aula 00

Microbiologia p/ EBSERH (Farmacêutico)

Somente em PDF- 2020

Autor:

Thaiana Cirqueira

20 de Fevereiro de 2020

APRESENTAÇÃO E CRONOGRAMA DO CURSO 2

Conceitos Básicos em Microbiologia 3

1 – Estrutura dos Microorganismos 4

2 – Características das Bactérias 7

Coleta de Amostras 15

1 – Locais da Coleta 15

2 – Transporte de Amostras 17

3 – Recebimento das Amostras 22

Meios de Cultura 23

Técnicas de Semeadura em Placas de Petri 38

Coloração para Microscopia 39

1 - Preparo de Esfregaço 40

2 - Coloração de Gram 41

3 - Coloração de Ziehl-Neelsen 47

4 - Outras Colorações 49

Provas de Controle de Qualidade 51

Questões Comentadas 52

APRESENTAÇÃO E CRONOGRAMA DO CURSO

Olá, amigos do Estratégia Concursos, tudo bem?

É com enorme alegria que damos início hoje ao nosso "**Curso Microbiologia para Concurso Público focado para o concurso da EBSERH 2019**". Antes de qualquer coisa, peço licença para me apresentar:

- Thaiana Cirqueira: Sou professora do Estratégia Concursos desde 2016. Sou Bacharel em Biomedicina pela Universidade Católica de Brasília, Mestre em Hemoterapia pela USP e Especialista em Direito Sanitário pela FIOCRUZ Brasília. Atualmente trabalho na Secretaria de Saúde do Distrito Federal exercendo atividades pertinentes as Análises Clínicas e Hemoterapia. Obtive aprovação em cinco concursos na área de Análises Clínicas e espero que com a minha experiência consiga ajudar vocês a alcançar o objetivo tão almejado da aprovação.

Vejamos como será o cronograma do nosso curso:

AULAS	TÓPICOS ABORDADOS
Aula 00	Introdução a microbiologia. Taxonomia, características morfo-tintoriais, fisiologia, patogenicidade e virulências bacterianas. Coleta, transporte e recebimento de amostras microbiológicas. Meios de cultura. Métodos de coloração para exames de microbiologia
Aula 01	Provas de sensibilidade a agentes antimicrobianos, Provas bioquímicas de identificação bacteriana.
Aula 02	Bactérias de interesse clínico
Aula 03	Virologia
Aula 04	Micologia Clínica

Espero que aproveitem bem este módulo e que todos alcancem a aprovação! Então vamos lá?

Um grande abraço,

Thaiana Cirqueira

CONCEITOS BÁSICOS EM MICROBIOLOGIA

Para darmos início aos nossos estudos, precisamos traçar um panorama geral sobre o que é a microbiologia.



O que é a microbiologia?



Basicamente, a **microbiologia** é o estudo dos microrganismos e suas atividades, a esses microrganismos damos os nomes de: bactérias, fungos, vírus, algas e protozoários. Muitos desses microrganismos são causadores de diversas patologias, e foi ai que surgiu a microbiologia médica, que estuda os microrganismos patogênicos responsáveis pelas doenças infecciosas. A microbiologia médica envolve o estudo da bacteriologia, da virologia e da micologia.

Os agentes causadores de doenças infecciosas envolvem cinco principais grupos de organismos: as bactérias, os fungos, os protozoários, os helmintos e os vírus.

1 – ESTRUTURA DOS MICROORGANISMOS

As bactérias são organismos pertencentes ao Reino Monera, já os fungos (divididos em leveduras e bolores) são pertencentes ao Reino Fungi, e os protozoários são membros do Reino Protista, e os helmintos (vermes) são classificados no Reino Animalia. Essa classificação se baseia em diferenças apresentadas por esses organismos.

Dessa forma, podemos citar diversas características essenciais que cada um desses organismos possui que os diferenciam uns dos outros. Por exemplo, as bactérias, os fungos, os protozoários e os helmintos são organismos celulares, enquanto os vírus são organismos acelulares. Essas diferenças são baseadas em três principais critérios:

- **Estrutural:** Os vírus não possuem citoplasma, por isso dependem das células hospedeiras para promover a síntese proteica.
- **Mecanismo de replicação:** Diferentemente das bactérias, que se replicam por fissão binária, os vírus desorganizam-se, e produzem várias cópias de seu ácido nucleico e proteínas, e depois se reorganizam em uma geração de múltiplos vírus. E ainda devem se replicar no interior de células hospedeiras, uma vez que são desprovidos de sistema de síntese de proteínas, como mencionado anteriormente.
- **Natureza do ácido nucleico:** O vírus, diferentes das outras células que contém DNA e RNA, eles possuem DNA ou RNA, mas não ambos.

Além de todas essas diferenças, os organismos ainda são classificamos em eucariontes e procariontes. Os fungos e protozoários são microrganismos eucarióticos, já as bactérias são microrganismos procarióticos. Essa diferenciação baseia-se na presença ou ausência de núcleo. Os **organismos eucarióticos** são aqueles que possuem **carioteca** (uma membrana que separa o material genético do citoplasma), já os **procarióticos** são aqueles que não apresentam carioteca. Além dessa diferença, os procariotos e eucariotos se diferenciam por outras características:



- As células eucarióticas apresentam organelas, como mitocôndrias, lisossomos e ribossomos, já procariotos não apresentam organelas, apenas ribossomos menores.
- Os procariotos apresentam parede celular externa que contem peptideoglicanos, ao contrário, as células eucarióticas não contem peptideoglicano, elas apresentam uma membrana celular mais flexível.
- A membrana da célula eucariótica contém **esteróis**.
- A maioria dos protozoários e algumas bactérias são móveis, enquanto os fungos e os vírus são imóveis.

Na tabela abaixo temos um resumo das principais características e diferenças entre os microrganismos citados acima.

Tabela 1 – Comparação entre os organismos de importância médica

CARACTERÍSTICA	VÍRUS	BACTÉRIAS	FUNGOS	PROTOZOÁRIOS/ HELMINTOS
CÉLULAS	AUSENTES	PRESENTES	PRESENTES	PRESENTES
DIÂMETRO APROXIMADO (µM)[1]	0,02-0,2	1-5	3-10 (LEVEDURAS)	15-25 (TROFOZOÍTICOS)
ÁCIDO NUCLEICO	DNA OU RNA	TANTO DNA COMO RNA	TANTO DNA COMO RNA	TANTO DNA COMO RNA
RIBOSSOMOS	AUSENTES	70S	80S	80S
TIPO DE NÚCLEO	AUSENTE	PROCARIÓTICO	EUCARIÓTICO	EUCARIÓTICO
MITOCÔNDRIAS	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	PRESENTE
NATUREZA DA SUPERFÍCIE EXTERNA	CAPSÍDEO PROTEICO E ENVELOPE LIPOPROTEICO	PAREDE RÍGIDA, CONTENDO PEPTIDEOGLI-CANO	PAREDE RÍGIDA, CONTENDO QUITINA.	MEMBRANA FLEXÍVEL
MOTILIDADE	NENHUM	ALGUMAS	NENHUM	A MAIORIA
MÉTODO DE REPLICAÇÃO	NÃO POR FISSÃO BINÁRIA	FISSÃO BINÁRIA	BROTAMENTO OU MITOSE	MITOSE

Lembrando que essa foi uma pequena introdução sobre a microbiologia. Ao decorrer do curso ainda falaremos diversos conceitos que serão extremamente importantes para o nosso estudo. Então, vamos ao primeiro tópico.

As análises das características morfológicas das bactérias são importantes para classificação preliminar e para o conhecimento de algumas propriedades importantes do ponto de vista industrial.

2 – CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS

Como já falamos as bactérias são organismos unicelulares. Podem ser encontrados de forma isolada ou em colônias; são constituídos por uma célula (unicelulares), não possuem núcleo celular definido (procariontes) e não possuem organelas membranosas.

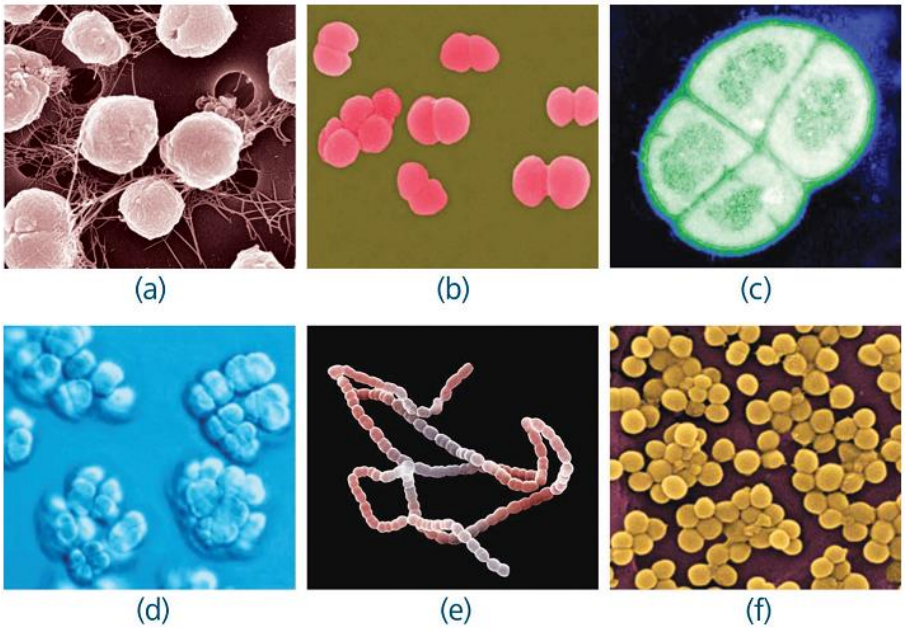
Morfologia: tamanho, forma e arranjos bacterianos

As bactérias são variáveis quanto ao tamanho e quanto às formas que apresentam.

- **Tamanho:**
  - A unidade de medida das bactérias é o mm (micrômetro) que equivale a 103 mm. Muitas bactérias medem de 2 a 6 mm de comprimento e 1 a 2 mm de largura. Tamanho variável: 0,1 – 0,2 m → 5,0 mm
- **Morfologia das bactérias: formas e arranjos bacterianos**
  - As bactérias podem ser agrupadas em três tipos morfológicos gerais: **cocos, bacilos e espiralados**.

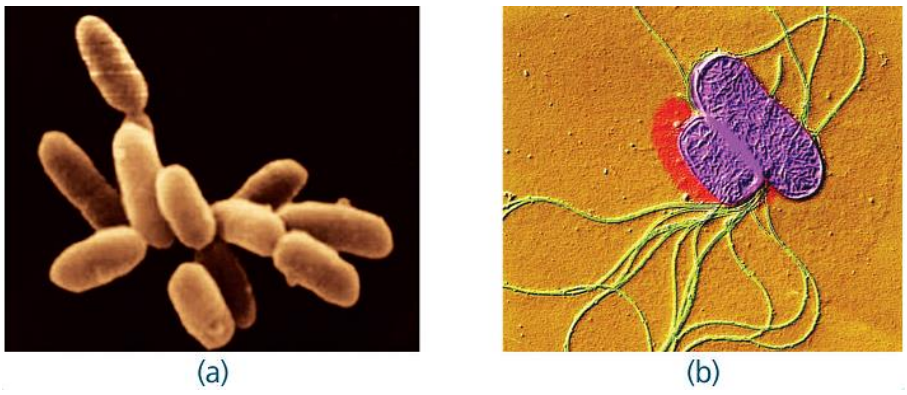
1) **Formas de cocos (esféricas)** – é o grupo de bactérias mais homogêneo em relação ao tamanho. Os cocos tomam denominações diferentes de acordo com o seu arranjo.

Micrococos – cocos.
Diplococos – cocos agrupados aos pares.
Tétrades – agrupamentos de quatro cocos.
Sarcina – agrupamentos de oito cocos em forma cúbica.
Estreptococos – cocos agrupados em cadeias.
Estafilococos – cocos agrupados em grupos irregulares, lembrando cachos de uva.



(a) Coco: *Methanococcus sp*; **(b) Diplococo:** *Neisseria sp* (gonococo); **(c) Tétrade:** *Deinococcus sp*; **(d) Sarcina:** *Methanosarcina sp*; (**e) Estreptococo:** *Streptococcus sp* e **(f) Estáfiococo:** *Staphylococcus SP*

2) **Forma de bastonete** – são células **cilíndricas** em forma de bastonete; apresentam grande variação na forma e no tamanho entre gêneros e espécies.



Exemplos de bastonetes: (a) Halobacterium e (b) Salmonella, causadora de aguda infecção intestinal em humanos.

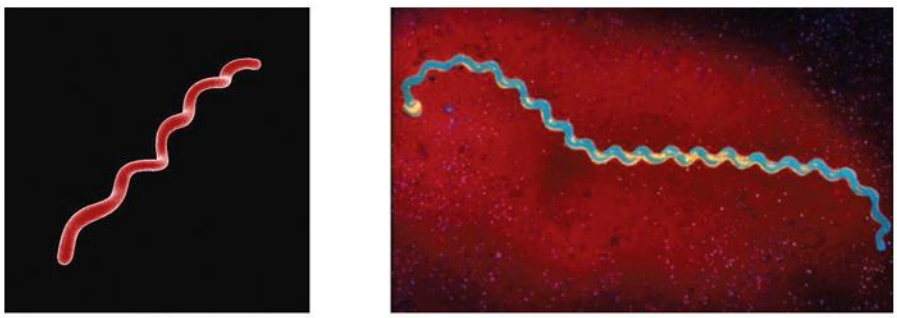
PRESTE MAIS ATENÇÃO!!

As células bacterianas cilíndricas ou em bastonetes (bacilos) não apresentam a mesma disposição dos cocos, mas podem apresentar-se isolados, aos pares (diplobacilos) e em cadeias (estreptobacilos). Em alguns casos esses arranjos não constituem padrões morfológicos característicos, mas é devido às etapas de crescimento ou às condições de cultivo. De um modo geral, essas duas formas de bactérias (cocos e bacilos) são as mais comuns entre as contaminantes nas indústrias de açúcar e de álcool.

3) Formas espiraladas – caracterizadas por células em espiral; dividem se em:

• **Espirilos** – possuem corpo rígido e movem-se à custa de flgelos externos.
Ex.: Gênero *Aquaspirillium*.

• **Espiroquetas** – são flexíveis e locomovem-se geralmente por contrações do citoplasma, podendo dar várias voltas completas em torno do próprio eixo.
Ex.: Gênero *Treponema*.

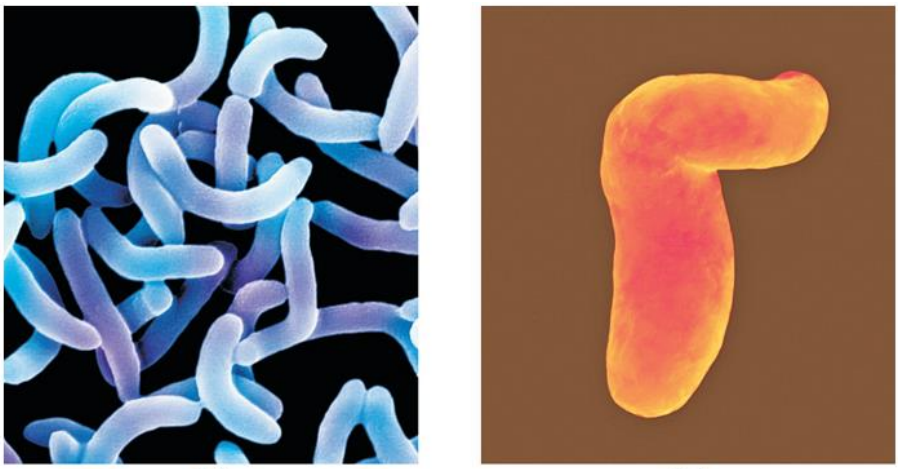


Exemplos de bactérias com formas espiraladas: (a) espirilo e (b) espiroqueta Leptospira interrogans, causadora da leptospirose.

TOME NOTA!

Além desses três tipos morfológicos, existem algumas formas de transição:

- Bacilos muito curtos: cocobacilo.
- Unidades celulares que se assemelham a uma vírgula: vibrião.



Formas bacterianas de transição: exemplos de vibriões (a) Vibrio cholerae, causador da cólera em humanos e (b) Vibrio vulnifius, agressiva bactéria carnívora.



(AOCP- HRL-UFS – 2016 – Biomédico). Estudos identificam as bactérias como seres unicelulares, constituídas basicamente de: membrana, citoplasma e núcleo. Esse conjunto tem o nome de PROTOPLASTO. Além disso, possuem outras estruturas que, apesar de importantes, nem sempre são encontradas em todas as bactérias como: parede, cápsula, flagelos e esporos. Assinale a alternativa INCORRETA a respeito do agrupamento das bactérias (cocos).

(A) Isolados – Micrococos.

(B) Aos pares – Diplococos.

(C) Em cadeias – Estreptococos.

(D) Em cachos regulares – Estafilococos.

(E) Em grupo de quatro – Tetrágenos.

Comentário: O erro dessa questão está em um detalhe, que pode ser uma pegadinha para quem faz a questão correta ou despercebidamente, o erro está em cachos regulares no item d, o correto é falar que os estafilococos são cachos irregulares. **Resposta: Letra D.**

Estruturas externas da célula bacteriana

O tamanho, a forma e o arranjo das bactérias constituem sua morfologia, sua aparência externa; a observação interna das estruturas celulares permite conhecer um pouco o funcionamento da bactéria no ambiente.

➢ **Parede celular:**

A parede celular é uma estrutura rígida que está presente em quase todas as bactérias e localiza-se acima da membrana citoplasmática. Ela contém **polímeros** complexos conhecidos como peptidioglicanos, que são responsáveis pela sua rigidez. A parede celular impede que a célula estoure em decorrência do grande turgor, atua como uma barreira de proteção contra determinados agentes químicos e físicos externos e funciona como suporte de antígenos somáticos bacterianos.

As bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos, com base na capacidade de suas paredes celulares fiarem o corante violeta cristal:



as **Gram-positivas (que coram em roxo)** e **as Gram-negativas (que coram em vermelho).**



A parede celular de bactérias **Gram-positivas** é composta basicamente por **peptideoglicano**, que constitui uma espessa camada ao redor da célula. Outros polímeros, tais como ácidos lipoteicóicos e polissacarídeos, também podem estar presentes nessa camada.

Nas bactérias **Gram-negativas** o peptideoglicano constitui uma camada final, sobre a qual se encontra outra camada, denominada membrana externa que é composta por lipoproteínas, fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos.

O processo de coloração de Gram é usado para **classificar as bactérias em Gram-positivas ou Gram-negativas**, conforme fixam ou não o corante. Essa classificação é importante, pois as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à penicilina e à sulfa. Este processo de coloração é um dos mais importante métodos realizados em laboratório de microbiologia.

- **Flagelos:**

São organelas especiais (apêndices delgados) responsáveis pela locomoção das bactérias. De acordo com o número e distribuição dos flgelos, as bactérias podem ser classificadas como: atríquias (sem flgelos), monotríquias (um único flagelo), anfiríquias (um flagelo em cada extremidade), lofotríquias (um tufo de flagelos em uma, ou ambas as extremidades) e peritríquias (apresentando flagelos ao longo de todo o corpo bacteriano).

- **Pêlos (Fímbrias):**

São apêndices fios, retos e curtos que estão presentes em muitas bactérias Gram-negativas. São encontrados tanto nas espécies móveis como nas imóveis e, portanto, não desempenham papel relativo à mobilidade. Os pelos originam-se de corpúsculos basais na membrana citoplasmática e sua função parece estar relacionada com a troca de material genético durante a conjugação bacteriana (fímbria sexual) com a aderência às superfícies mucosas.

- **Glicocálice:**

É formado por uma substância mucilaginosa ou gelatinosa (viscosa) e fia ligada à parede celular como um revestimento externo. Se o glicocálice estiver organizado de maneira definida e acoplado firmemente à parede celular, recebe o nome de cápsula (Figura 3.11); se estiver desorganizado e sem qualquer forma frouxamente acoplada à parede celular, recebe o nome de camada limosa. O glicocálice pode ser de natureza polissacarídica ou polipeptídica (ácido glutâmico). O glicocálice desempenha papel

importante na infecção, permitindo que a bactéria patogênica se ligue a tecidos específicos do hospedeiro. Acredita-se que o glicocálice possa proteger as bactérias da dessecação.

Fatores limitantes do crescimento bacteriano

A oferta de nutrientes é o principal fator que limita o crescimento bacteriano. Outros fatores importantes no crescimento bacteriano são: temperatura, pH, disponibilidade de O2 e quantidade de água.

- **Temperatura** – algumas bactérias crescem melhor em temperaturas baixas, outras em temperaturas intermediárias e outras em temperaturas altas. **A temperatura ótima de crescimento é aquela em que o microrganismo cresce mais rapidamente**. Em temperaturas mais favoráveis para o crescimento, o número de divisões celulares por hora, chamada de taxa de crescimento, dobra para cada aumento de temperatura de 10ºC. Há três temperaturas importantes a conhecer: mínima, ótima e máxima (nessa última as enzimas são danificadas pelo calor e a célula para de crescer). De acordo com a temperatura de crescimento, é possível distinguir, pelo menos, três grupos fisiológicos de bactérias: as **psicrófilas** têm temperatura ótima de crescimento entre 15 - 25ºC; as **mesófilas** têm temperatura ótima de crescimento entre 25 - 45ºC; e as **termófilas** têm temperatura ótima de crescimento entre 45 - 80ºC.
- **pH** – quanto à tolerância ao pH, as bactérias podem ser **acidófilas, neutrofílicas e alcalófilas**. Normalmente, o pH ótimo é bem definido para cada espécie e a maioria das bactérias não cresce em valores de pH acima ou abaixo de seu pH ótimo.
- **Oxigênio** – quanto à respiração, as bactérias podem ser: **aeróbias estritas** (necessitam de O2 para crescer), **anaeróbias estritas** (só crescem na ausência de O2), **microaerofílicas** (precisam de O2, mas em pressão inferior à atmosférica) e **anaeróbias facultativas** ou **aerotolerantes** (crescem na presença ou ausência de O2).

● **Água** – essencial a qualquer microrganismo; embora a necessidade seja variada, somente endósporos bacterianos podem sobreviver sem água.

COLETA DE AMOSTRAS

A etapa da coleta da amostra é essencial para o sucesso da identificação do patógeno. Por isso, devem-se coletar as amostras DIRETO do sítio de infecção. Além disso, deve-se coletar a amostra no momento ideal em que o microrganismo manifestará sua patogenicidade. O volume de material colhido deverá ser suficiente para realizarmos todas as técnicas necessárias ao cultivo, mas sempre tomando cuidado com a coleta de material excessivo.

Para realizarmos a coleta, utilizamos os *swabs,* pois são de fácil manipulação.

1 – LOCAIS DA COLETA

Em primeiro lugar, devemos sempre nos preocupar com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) adequados a essas atividades (luvas, máscaras).

Vamos destacar os principais sítios anatômicos de coleta de amostras:

1. **Trato respiratório superior:** A microbiota da boca, garganta e nasofaringe é bem numerosa. Na maioria dos casos, os swabs de orofaringe são realizados para isolar estreptococos hemolíticos do grupo A, que causam faringite. Nesse sítio, devemos coletar a amostra na cavidade oral, entre os pilares tonsilares e atrás da úvula.
2. **Trato respiratório inferior:** A coleta é feita direto do escarro das vias respiratórias inferiores. A coleta do escarro deve ser feita preferencialmente pela manhã, quando o paciente se levanta, e em jejum.
3. **Trato urinário:** Para coleta do trato urinário feminino, primeiro deve ser feito a higienização no local, depois descartar o primeiro jato de urina e coletar o jato médio da micção em recipiente estéril.

4. **Trato genital:** As culturas de amostras vaginais podem muitas vezes não apresentar resultados significativos. Em caso de vaginite supurativa, devem-se montar lâminas a fresco logo após a coleta e examinar.
5. **Sangue:** O momento ideal para coleta de sangue é quando ocorre a bacteremia (presença de bactéria no sangue). As hemoculturas podem ser obtidas utilizando-se agulha e seringa ou métodos de vácuo, como o sistema fechado. O local da punção deve ser descontaminado de forma adequada.
6. **Lesões cutâneas:** Fazer a aspiração do material purulento localizado nas profundidades da ferida com agulha e seringa estéreis.
7. **Trato gastrointestinal:** A confirmação laboratorial de uma infecção intestinal efetua-se, usualmente, pela detecção de ovos e parasitas, por montagens de material fecal com solução salina ou iodada, ou isolando-se bactérias de amostras de fezes.
8. **Líquido cefalorraquidiano (líquor):** Obtido por um medico neurologista, por punção lombar, após desinfecção conveniente da pele e anestesia local.

Quando escolhemos um método de coleta temos que pensar em preservar os microrganismos até a chegada ao laboratório. A coleta é um dos passos mais importante do exame de microbiologia. Se a coleta for inadequada o resultado final será inadequado. Para uma coleta de qualidade é necessário:

- Coletar o material do sítio de infecção com técnica de antissepsia adequada.
- Escolher o momento apropriado para a coleta do espécime clínico que propicie a melhor chance de isolar o microrganismo causador da infecção.
- Quantidade suficiente para realização dos exames solicitados pelo médico.
- Materiais de coleta e transporte adequados conforme amostra analisada.
- Sempre que possível coletar amostra antes da administração de antimicrobianos no paciente
- A amostra sempre deve estar com identificação completa do paciente. Nome, data de nascimento, número de identificação do paciente, sítio de coleta, data e hora da coleta.

Após a coleta, devemos garantir as condições necessárias para o armazenamento e transporte dessa amostra.

2 – TRANSPORTE DE AMOSTRAS

Os materiais coletados devem ser enviados para o laboratório em meios de transporte adequados de acordo com o material em estudo. Abaixo segue uma tabela com o meio de transporte, uma pequena descrição e o respectivo material a ser analisado:

Tabela 02- Tipos de meio de transporte com o respectivo material a ser transportado.

Meio de Transporte	Material
Frasco de coleta com boca larga e com tampa de rosca.	Urina, fezes e escarro.
***Swabs* com meio de Stuart ou Amies.**	Isolamento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas.
***Swabs* com meio de Stuart ou Amies com carvão.**	Isolamento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. Principalmente gonococos, hemófilos e pneumococos.
Meio de Cary-Blair	Conservantes de fezes para isolamento de enteropatógenos.
Meio de transporte pré-reduzido	Isolamento de bactérias anaeróbias

Meio TSA em tubo	Envio de cepas para exames complementares ou para confirmação em laboratórios de referência.

Os meios de transporte preservam a viabilidade dos microrganismos nas amostras, mas evitam a proliferação bacteriana.

Coleta e/ou transporte inadequado podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico causador da doença.

Para cada material em análise existe critérios diferentes para o melhor e mais adequada realização do exame. A tabela abaixo é um esquema com cada material, o tempo de envio ao laboratório, estabilidade da amostra e temperatura de transporte:

Tabela 3- Tipos de amostras com os critérios necessários para transporte.

Tipo de amostra	Material de coleta	Tempo e temperatura até envio ao laboratório	Estabilidade da amostra	Temperatura de transporte
Aspirado e exsudatos	Seringa	< 2h em TA	<24h refrigerada	TA
	Swab com meio de transporte e lâmina para Gram	< 8h em TA	<24h refrigerada	TA
	Swab sem meio de transporte e lâmina de Gram	Imediatamente	Não aplicável	TA
Escarro	Frasco estéril	< 2h em TA	<24h refrigerada	TA
Secreção Traqueal	Frasco estéril	< 2h em TA	<24h refrigerada	TA
Lavado Broncoalveolar	Frasco estéril	< 2h em TA	<24h refrigerada	TA
Nasal	*Swab* com meio de transporte e lâmina de Gram	< 12h em TA	<24h em TA	TA
	Tudo estéril	< 2h em TA	<24h refrigerada	TA

Líquidos Orgânicos (pleural, peritoneal, ascítico, diálise, pericárdico, sinovial)	Frasco de hemocultura, método automatizado	< 12h em TA	<24h em TA	TA
	Frasco de hemocultura, método manual	< 2h em TA ou 12h a 35+/- 2°C	<12h em TA	TA
Sangue e Medula óssea	Frasco de hemocultura, método automatizado	< 12h em TA	<12h em TA	TA
	Frasco de hemocultura, método manual	< 2h em TA ou 12h a 35+/- 2°C	<12h em TA	TA
Fragmentos de biópsia, tecido e osso	Tubo ou frasco contendo solução fisiológica estéril	< 2h em TA	<24h refrigerada	TA
Fezes	Frasco estéril seco	< 1h em TA	<24h refrigerada se coloca em meio conservante	TA
	Com conservante	<12h TA ou 24h refrigerada	<48h refrigerada	TA
Líquor	Tubo estéril	Imediatamente, TA	<24h refrigerada	TA

Cateter	Tubo estéril	<1h em TA	<12h refrigerada	TA
Raspado da conjuntiva	Swab fino com meio de transporte	<2h em TA	<24h em TA	TA
Raspado de córnea	Semeadura diretamente em meio adequado	< 2h em TA	<12h em TA	TA
Fluido vítreo	Seringa com ponta protegida ou frasco de hemocultura	Imediatamente em TA	<12h refrigerada	TA
Urina de jato médio	Frasco estéril	<2h em TA ou Até 12h refrigerada	< 24h refrigerada	Refrigerada
Esperma	Frasco estéril	<2h em TA	<12h refrigerada	TA
Cultura de anaeróbio	Vol. > 2ml, seringa com ponta bloqueada, sem bolha de ar	< 3h em TA	<12h refrigerada	TA
	Frasco de hemocultura, método automatizado	< 12h em TA	<24h em TA	TA

	Frasco de hemocultura, método manual	<2h em TA ou 12h a 35°C +/- 2°C	<12h em TA	TA
	Vol. <1ml, seringa com ponta bloqueada, sem bolha de ar	< 30 min. em TA	<1h refrigerada	TA

Sendo TA = temperatura ambiente.

3 – RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

O recebimento das amostras é uma etapa fundamental para um exame de qualidade. O primeiro passo a ser realizado é a inspeção visual para aceitação das amostras. Deve-se observar:

- Se a amostra está identificada (nome do paciente, sítio anatômico, data e hora da coleta).
- Se o volume é adequado e suficiente para realização dos exames.
- Se a amostra foi coletada nos meios de transportes adequados.
- Se a amostra é apropriada para o exame solicitado.



Lembrando, que é recomendável que todo o processamento seja feito em cabine de segurança biológica, utilizando equipamentos de proteção individual, conforme normas de biossegurança.

MEIOS DE CULTURA



O que são os meios de cultura?

São os meios destinados **para reprodução, isolamento e análise dos microrganismos de interesse médico**. Nesses meios, é utilizado um conjunto de substâncias que são capazes de promover o crescimento bacteriano de laboratório *in vitro*.

Os meios de cultura precisam de alguns suprimentos que irão permitir o crescimento dos microrganismos, como fonte de carbono e nitrogênio, fonte de energia, sais minerais, fatores de crescimento, condições físicas (pH, temperatura, pressão osmótica), e condições ambientais favoráveis (ambiente estéril).

Bom, para escolhermos qual será o meio mais adequado, vamos analisar as características que cada um apresenta.

Primeiro, precisamos classificar os meios de cultura quanto ao estado físico, quanto à procedência dos constituintes e quanto à composição química.

- **Estado físico:** Podemos classificar os meios em sólidos, quando contém agentes solidificantes, principalmente Agar (1,00 a 2,00%; semi-sólidos, quando a quantidade de Agar e ou gelatina é de 0,075 a 05%, formando uma consistência intermediária; e líquidos, quando não possuem agentes solidificantes, apresentando-se como um caldo. O crescimento bacteriano, nesse meio, muda seu
aspecto, ou seja, o meio sofre uma turvação.

- **Procedência dos constituintes:** São definidos como naturais ou complexos quando são utilizados ingredientes **que possuem composição química não definida**, como extratos de vegetais (malte, tomate, amido de tubérculos), de animais (carne, cérebro, fígado) e de microrganismos. Quando são utilizados ingredientes **quimicamente definidos** chamamos de artificiais ou sintéticos. Os artificiais ou sintéticos são aqueles que oferecem suprimentos exigidos pelos microrganismos para favorecer seu crescimento, como nitrogênio, sais minerais, vitaminas, dentre outros.

- **Composição química:** São divididos em meios básicos ou especiais. Os básicos permitem o crescimento microbiano, **mas sem satisfazer nenhuma condição especial.** Já os especiais, são aqueles que **cumprem as exigências necessárias** para que determinado microrganismo cresça naquele meio.



➔ **Mas professora, o que é o ágar?**

O ágar, também conhecido como ágar-ágar ou agarose, é um hidrocolóide fortemente gelatinoso. É bastante empregado em microbiologia para produção de meios de culturas sólidos. O meio de cultura é feito a partir do ágar adicionado outros componentes específicos para cada tipo de microrganismo, pois estes possuem diferentes necessidades nutricionais.



(AOCP- EBSERH/HC-UFG – 2015). Meios de cultura podem ser sólidos, semissólidos ou líquidos. O componente mais utilizado para a solidificação de meios de cultura estéreis é o:

A) álcool 70%.
B) xilol.
C) ágar-ágar.
D) formol.
E) Metanol

Comentário: O componente utilizado nos meios de cultura é o ágar-ágar, um hidrocoloide que forma base gelatinosa dos meios de cultura.
Resposta: Letra C

Principais tipos de meio de cultura:

Podemos dividir os meios de cultura em vários tipos. Vamos relacionar aqui aqueles mais cobrados em prova e que são os mais importantes na análise microbiológica.

Podemos dividir os meios em:

- Meios para transporte/conservação;
- Meios de crescimento (enriquecidos ou não);
- Meios de enriquecimento;
- Meios seletivos;
- Meios diferenciais;
- Meios cromogênicos;



Vamos nos atentar para cada característica que diferencia os meios apresentados, pois as bancas costumam cobrar bastante a composição e a definição de cada meio!!!

Meios de transporte/conservação:

São os meios que preservam a viabilidade dos microrganismos nas amostras coletadas, além de minimizarem a proliferação bacteriana. Em geral, são meios semissólidos para evitar a dissecação da amostra e são meios que não possuem fonte de carbono, para evitar que ocorra uma multiplicação bacteriana, interferindo no resultado do exame.

- Amies: modificação do Stuart: O Stuart é um meio que utiliza glicerosfato de sódio, porém, ele permitia o crescimento de contaminantes, por isso, foi criado o meio Amies, que utiliza fosfato inorgânico para eliminar o crescimento de contaminantes.
- Cary-Blair: é o meio utilizado para transporte e preservação de amostra de fezes para cultura. Nesse meio, existem componentes que promovem o tamponamento da amostra, mantendo as bactérias viáveis e impedindo sua multiplicação. Conserva a maioria dos enteropatógenos especialmente *Vibrio cholerae* e *Campylobacter spp*.
- TSB (Caldo Soja Tripticaseína): é o meio de cultura utilizado para o crescimento de bactérias em geral, pois possui **peptonas** na formula, que é altamente nutritivo para os microrganismos.
- Skim-Milk: é utilizado para preservação de microrganismos e recomendado para o cultivo e enumeração de microrganismos encontrados na indústria de lacticínios.

Meios de crescimento:

São classificados em: líquidos, sólidos e semissólidos;

Vamos começar pelos **meios líquidos**:

- Caldo BHI (Brain Heart Infusion): é composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, peptona e dextrose, são utilizados para cultivo de estreptococcos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.
- TSB (Triptic Soy Broth): é um **meio não enriquecido** utilizado para o crescimento de bactérias em geral.

Meios de enriquecimento:

São aqueles meios líquidos ricos em nutrientes que permitem que as bactérias contidas na amostra coletada cresçam quantitativamente. Apesar de serem meios que estimulam o crescimento de determinados microrganismos, **podem inibir o crescimento de outros.**

- Caldo Tetrationato de Kauffman: é um meio composto por sais de bile que impedem o crescimento de bactérias gram-postivas, e iodo, que cria um ambiente favorável para o crescimento de espécies fecais. É um meio de enriquecimento para ***Salmonella***.
- Selenito-Cistina: é um meio utilizado para inibir o crescimento de estreptococos e coliformes fecais e permite o crescimento de ***Salmonella***.

- Caldo Tioglicolato: é um meio de enriquecimento para ***Clostridium perfringens***.



ATENÇÃO!!! Cuidado para NÃO confundir os MEIOS ENRIQUECIDOS com os MEIOS DE ENRIQUECIMENTO!!! Os meios de enriquecimento, como os caldos tetrationato de Kauffman e selenito possuem produtos seletivos ou proporcionam SOMENTE o crescimento de determinado

Meios seletivos e diferenciais:

Os **MEIOS SELETIVOS** são aqueles que permitem selecionar e isolar organismos específicos que estão misturados com outros em uma mesma amostra, **através da adição de inibidores que irão impedir o crescimento de organismos não desejados e favorecer o crescimento daqueles organismos que se deseja isolar.** Um exemplo disso é adicionar Cristal-Violeta que impede o crescimento de Gram-positivos, e favorece o crescimento de Gram-negativos. Também é bastante comum adicionar antibióticos que irão agir sobre as bactérias sensíveis e não terão efeito sobre as bactérias resistentes.



Os **MEIOS DIFERENCIAIS** são meios que devido a adição de alguns reagentes ou substâncias resultam em um tipo de crescimento ou reação específica, **o que permite estabelecer diferenças entre microrganismos muito parecidos.** Por exemplo, a **incorporação de lactose e de um indicador de pH:** fermentadores ou não deste açúcar nos permite diferenciar as bactérias lactose (+) e lactose (-), pois elas formam cores distintas.



O meio **Eosina Azul de Metileno (EBM)** é diferencial para coliformes; O **Agar MacConkey** para a diferenciação de enterobactérias; e o **Agar sangue e Agar Baird-Parke**r para isolamento e diferenciação de cocos Gram positivos.



Vamos estudar as características principais de cada meio e assim escolher corretamente qual meio será utilizado para o cultivo de cada amostra.

- Agar Sal manitol: meio **seletivo** usado para o isolamento de estafilococos patogênicos. Nesse meio tem caseína e tecido animado, extrato de carne, manitol, sais e vermelho fenol. Os principais patógenos isolados nesse meio é o *S. aureus*, que crescem na presença de sais e **fermentam manitol**, produzindo colônias amarelas neste meio.



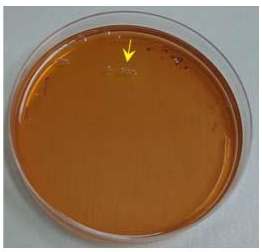
- Placa de Agar Sal manitol utilizado para diferenciar *S. aureus* e o *S. não aureus*, já que o *S. aureus* fermenta manitol, acidificando o meio que passa de rosa para amarelo.

- Agar SS: Possui componentes (sais de bile, verde brilhante e citrato de sódio) que inibem microrganismos Gram-Positivo. É meio **seletivo** para detecção de *Salmonella* e *Shighella*, em culturas entéricas. Encontramos nesse meio extrato de levedura com xilose, lisina, lactose, sucrose, desoxicolato de sódio, tiossulfato de sódio, citrato de ferro amoniacal e vermelho de fenol. Quando o meio de cultura forma colônias rosa é porque possui a presença de microrganismos que fermentam a lactose, sacarose ou xilose. A *Shighella* não fermenta esses carboidratos, portanto, formam COLÔNIAS TRANSPARENTES. A *Salmonella*, na presença de citrato de ferro amoniacal, formam **COLÔNIAS PRETAS**!! Sendo possível diferenciar Salmonella e Shighella. ANOTA AI QUE ESSA CAI NA PROVA!

ESTA CAI na prova!

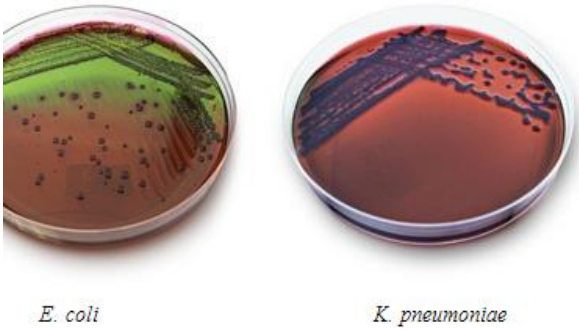

Escherichia coli


Salmonella


Shigella

- Agar SS: a *E. coli* fermenta lactose alterando o meio para rosa. A *Shigella* não fermenta lactose e não altera a coloração do meio, formando colônias transparentes. E a *Salmonella* não fermenta lactose, mas reagem formando gás sulfeto, alterando a cor do meio para colônias pretas.

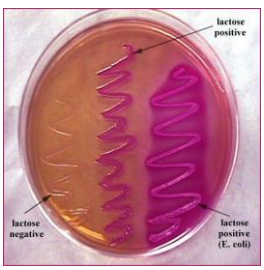
- Agar Eosin Methylene Blue (EMB): Ligeiramente seletivo (inibe Gram positivas em determinado grau) e indica fermentação de lactose (meio indicador). As colônias fermentadoras apresentaram coloração azul/preto, as que não são fermentadoras irão apresentar coloração roxo claro ou sem cor. A principal indicação para o uso desse meio é diferenciação dos coliformes.



E. coli *K. pneumoniae*

- EMB: utilizado para diferenciar enterobactérias gram-negativas. Os coliformes produzem colônias pretas-azuladas. A E. coli fermenta rapidamente a lactose, formando colônias verde metalizado.

- Agar MacConkey: meio seletivo para bactérias **Gram-negativas** e diferencial para **bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose**. A composição do Agar MacConkey envolve peptonas, sais biliares, lactose, vermelho neutro e cristal violeta. Os sais biliares e o cristal violeta presentes no meio inibem bactérias Gram-positivas. As bactérias **fermentadoras de lactose** produziram ácidos que alterando a cor do meio para **vermelha**.



Agar MacConkey: utilizado para diferenciar bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose. As bactérias que fermentadoras alteram a coloração do meio para rosa.

- Agar Sangue: possuem dois principais componentes: um meio base (p. ex: triptona de soja, infusão de coração e cérebro, base *Brucella*); e sangue (de carneiro, cavalo ou coelho). Nesse meio podem ser adicionados outros suplementos que vão permitir alcançar um maior leque de microrganismos. É um meio utilizado para a diferenciação

de *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus* spp, **pela formação de halos de hemólise nítidos**.

- Agar chocolate: É um tipo de Agar sangue modificado. No Agar sangue temos a presença de sangue, claro né? Então, quando o sangue ou a hemoglobina são adicionados ao meio base ainda quente, o meio passa a ser marrom (por isso o nome de Agar chocolate :D). Esse meio **favorece o crescimento da maioria das bactérias**, incluindo algumas que não crescem em Agar sangue.



Agar Sangue com a presença de E. coli e Agar chocolate que permite o crescimento de diversas bactérias como *Haemophilus*, *Neisseria* e *Moraxella*.

- Agar Mueller-Hinton: meio **utilizado para teste** rotineiro de suscetibilidade das bactérias. A sua composição é de extratos de carne e caseína, sais, cátions divalentes e amido solúvel.

- Caldo tioglicolato com indicador: Esse meio possui indicadores, a resazurina e azul de metileno. Esses indicadores avaliam a **presença de bactérias aeróbias**, pois possuem um alto potencial de oxidação. Além dos **aeróbios**, avalia a presença de **microaerófilos** e **anaeróbios**.

- Caldo tioglicolato sem indicador: Usado para cultivo de microrganismos **anaeróbios**.

(CESPE- HEMOBRÁS). O meio denominado ágar-sangue é um meio considerado básico, visto que contém substâncias que inibem o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos, permitindo o crescimento de outros.

Comentário: O meio de Ágar sangue, é um meio rico em nutrientes, que possibilita condições de crescimento para a maioria dos microrganismos.
Resposta: Errado.

Meios cromogênicos:

Eles permitem a identificação dos microrganismos baseada nas **diferentes colorações das colônias**, causada pelas reações enzimáticas da espécie ou gênero específico com os substratos que foram incorporados no meio de cultura. Esses meios permitem a identificação direta dos principais uropatógenos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonie*, *Proteus mirabilis* e *Enterococcus spp*), em 24 horas após incubação.

Pronto, finalizamos nossos estudos sobre os meios de cultura! Lembrando que os meios de cultura devem ser armazenados em locais adequados. Para armazenar por um período curto, as culturas podem ser mantidas à temperatura de refrigeradores (4 a 10ºC).

Depois de estudarmos todos esses tipos de meios de cultura, fica a seguinte pergunta: Qual a importância e por que temos tantos meios de cultura disponíveis?

A resposta é simples, a escolha para o processamento inicial das amostras é muito importante e está **condicionada à flora patogênica do local da coleta**. Em geral, se utiliza mais de um meio porque a maioria das doenças são causadas por uma variedade de organismos, então é importante que o laboratório de diagnóstico seja capaz de selecionar os meios apropriados para o isolamento dos microrganismos mais comuns e selecionar meios especializados quando o clinico suspeitar de um organismo específico.





Meio de cultura seletivo	É um meio que por adição de algum componente permite o crescimento somente de um determinado tipo de bactéria, inibindo o crescimento de outras bactérias.
Meio de cultura diferencial	É um meio que contém substâncias que permitem estabelecer diferenças presuntivas entre as bactérias possibilitando distinção dos gêneros. Evidencia-se a mudança de coloração ou morfologia da colônia.

São os meios mais frequentes empregados nas rotinas de laboratórios de microbiologia:

- **Ágar Sangue (AS):**

Finalidade: meio não seletivo e diferencial que permite o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de permitir a visualização de hemólise.

- **Ágar Chocolate (CHOC):**

Finalidade: meio nutritivo que permite o crescimento da maioria das bactérias, especialmente *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae.*

- **Thayer-Martin (TM):**

Finalidade: meio seletivo utilizado para isolamento de *Neisseria gonorrhoeae e neisseria meningitidis*. Inibe a maioria das outras bactérias.

- **MacConkey (MC):**

Finalidade: meio seletivo e diferencial que permite o crescimento de gram-negativos, realizando o teste de lactose, positiva ou negativa. Inibe o crescimento das bactérias gram-positivas.

- ***Eosin Methilene Blue* (EMB):**

Finalidade: Meio seletivo e diferencial que permite o crescimento de gram-negativos, realizando a diferenciação em lactose positiva ou negativa. Inibe crescimento de bactérias gram-positivas.

- ***Salmonella-Shigella* (SS):**

Finalidade: Meio seletivo e diferencial para o isolamento das bactérias *Salmonella spp.* e *Shigella spp*. Detecta a produção de H2S.

- **Colistin Nalidixic Agar (CNA):**

Finalidade: meio seletivo para estreptococos e enterococos. A colistina inibe as bactérias gram-negativas e o ácido nalidíxico o véu de *Proteus spp.*

- **Caldo Tioglicolato (THIO):**

Finalidade: meio de enriquecimento que favorece o desenvolvimento da maioria das bactérias. Meio líquido!

- **Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar (CLED):**

Finalidade: meio que permite o crescimento tanto de bactérias gram-negativas como gram-positivas. Devido a sua composição deficiente em eletrólitos, há inibição do véu de *Proteus spp.* Utilizado nas amostras de urina.

- **Caldo Tetrationato (TETRA):**

Finalidade: meio de enriquecimento para *Salmonella spp*.

- **Caldo Todd-Henwitt (TODD):**

Finalidade: meio de enriquecimento suplementado com ácido nalidíxico e gentamicina ou colistina para o isolamento de estreptococos.

- **Cromoágar (CROMO):**

Finalidade: Meio cromogênico (aquele que muda a colônia de cor conforme a bactéria em questão) – disponível para cultura de fezes, urina, vigilância epidemiológica, cultura para Candida spp. e pesquisa de resistência de alguns antibióticos.

Já vimos como é feita a coleta das amostras, já vimos como selecionar o meio adequado para cultivo e crescimento dos microrganismos, e agora iremos estudar as técnicas de semeio nas placas de Petri. Então, vamos começar!

TÉCNICAS DE SEMEADURA EM PLACAS DE PETRI

- **Esgotamento de Alça**

Técnica usada fundamentalmente para se **isolar colônias**. Consiste em depositar sobre um ponto da superfície do meio uma alíquota do material e depois espalhá-lo em três a quatro setores, com o auxílio de uma alça bacteriológica, sem recarregá-la com mais material afim de que progressivamente a quantidade do material seja menor na placa, assim proporcionando colônias isoladas.



Imagem 6 – Exemplificação da Técnica de Esgotamento de Alça

- **Spread-plate/distensão/varredura de campo:**

O objetivo desta técnica é obter um crescimento uniforme e confluente ou para contagem de colônias bacterianas. É bastante utilizado nas técnicas de antibiograma, cultura de urina, aspirado traqueal e lavado brônquico. Com uma alça bacteriológica faz um risco no meio da placa e depois movimentos de zig-zag nos dois sentidos.

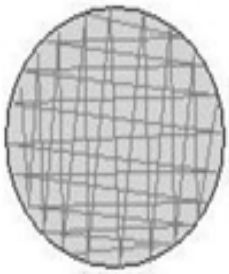


Imagem 7 – Exemplificação da Técnica Varredura de Campo.

COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA

Bom, como o próprio nome diz, a coloração significa corar os microrganismos com uma substância que irá enfatizar certas estruturas e assim permitir a sua identificação. Essas substâncias são conhecidas como corantes. Mas para que os corantes façam sua função, precisamos primeiro fixar (aderir) os microrganismos à lâmina. Para isso, é feito um **esfregaço** do material na lâmina e depois deixar secar. Só depois da lâmina seca que poderá ser feito o processo de coloração.

Eita, vamos por partes!

1- PREPARO DE ESFREGAÇO

Como é feito a preparação do esfregaço?

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, após flambada em chama de bico de Bunsen até ficar na cor rumbro (esperar esfriar para não matar as bactérias!), depositar o material em estudo sobre uma lâmina limpa realizando um movimento homogeneizador.

Nos casos de amostras em *swab* utilizar para suspender uma pequena quantidade de solução fisiológica estéril para realizar o esfregaço em lâmina.

Já nas amostras de aspirado, exsudatos, escarros e fezes lembrar de selecionar a parte mais purulenta para a realização do esfregaço, e ter o cuidado de espalhar a amostra em ¾ da lâmina para formar um fino esfregaço.

Deve-se deixar secar ao ar e fixar no calor brando. A fixação pelo calor deverá ser entre 45 a 60ºC.



(AOCP - EBSERH/HE-UFSCAR). Um técnico deve preparar uma lâmina utilizando a técnica de coloração de gram. Antes da coloração, ele coloca uma gota do material contaminado com bactérias sobre a lâmina, espera secar e realiza a técnica de coloração. Ao final, o técnico realiza o exame da lâmina no microscópio e percebe que não há material na lâmina. Isso ocorreu porque:

A) não há bactérias gram positivas ou negativas no material examinado.
B) o técnico não utilizou lamínula durante a coloração.
C) a coloração de gram pode ter lisado a parede das bactérias.
D) o técnico não realizou a fixação do esfregaço antes da coloração.
E) o material necessita ficar em repouso por um dia antes da coloração.

Comentário: A fixação em calor é um passo fundamental na realização do preparo de uma lâmina, logo, provavelmente quando houve o processo

Depois de preparado o esfregaço, iniciaremos a nossa coloração. Aqui, vamos abordar os dois tipos de coloração mais utilizados.

2- COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, daí o nome coloração de Gram :D. Esse método as bactérias em dois grandes grupos: **as bactérias gram-negativas e as bactérias gram-positivas**. Mas para entendermos a coloração de gram, precisamos diferenciar as bactérias em gram-negativas e gram-positivas.



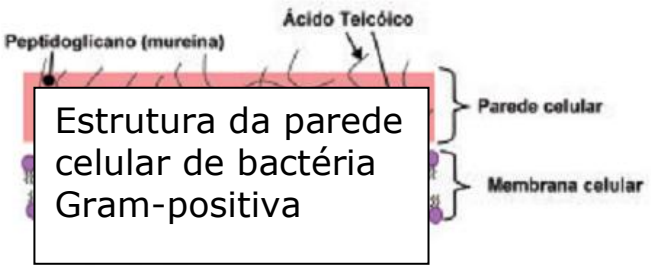
A principal diferença entre as bactérias gram-negativas e gram-positivas é a **composição da parede celular**. Basicamente, a parede celular de uma bactéria é uma estrutura **complexa e semi-rígida, responsável pela forma da célula**. E aí, vamos ver as diferenças entre a parede celular das bactérias gram-negativas e gram-positivas:

- Gram-positivas: A parede celular das bactérias gram-positivas consiste de muitas camadas de **peptideoglicano** que formam uma estrutura espessa e rígida. Além dos peptideoglicanos, a parede celular das gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem basicamente em um álcool (glicerol ou ribitol) e fosfato;
- Gram-negativas: Em contraste, a parede celular das bactérias gram-negativas contém **somente uma** camada fina de peptideoglicano, mas apresentam uma

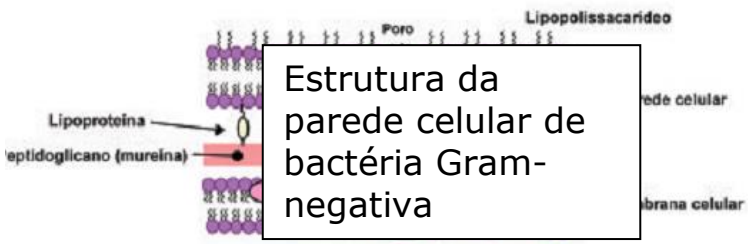
membrana externa lipídica que não está presente nas gram-positivas. E diferente das gram-positivas, na parede celular das gram-negativas não contêm ácidos teóicos;

Resumindo

A parede celular das bactérias **gram-negativas é quimicamente mais complexa**, porque possui maior quantidade de aminoácidos e lipídeos. A membrana externa presente nas bactérias gram-negativas não fornecem uma barreira para todas as substâncias no ambiente, pois os nutrientes devem atravessá-la para manter o metabolismo da célula. O componente lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das bactérias gram-negativas atua como antígenos e são úteis para diferenciar as espécies das bactérias.



Estrutura da parede celular de bactéria Gram-positiva

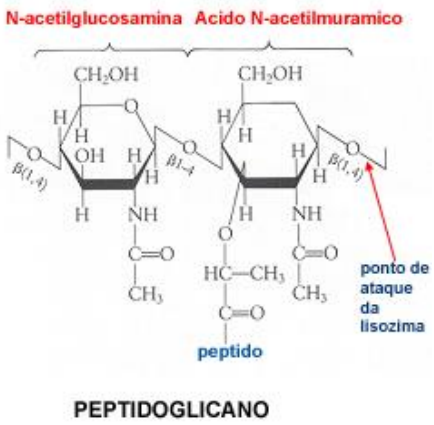


Estrutura da parede celular de bactéria Gram-negativa

INDO mais fundo

O **peptideoglicano** é um dissacarídeo (açúcar) repetitivo unido por polipeptídeos (aminoácidos) para formar uma rede que circunda e protege toda a célula. A porção dissacarídica é composta de monossacarídeos denominados N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), que estão relacionados à glicose.

Estrutura química do pepetidioglicano



PEPTIDOGLICANO

Agora que sabemos as diferenças entre as bactérias gram-negativas e gram-positivas, entenderemos o principio da coloração de Gram.

A coloração de Gram se baseado nas diferenças estruturais da parede celular das bactérias gram-negativas e gram-positivas, e como cada uma reage aos vários reagentes.

O corante principal é o **violeta de genciana**, que cora as células de púrpura, já que o corante entra no citoplasma de ambos os tipos de células. Quando o **iodo** é

aplicado, ele **forma cristais com o corante**, e aí em seguida, aplica-se o **álcool**, que irá desidratar o peptideoglicano das células gram-positivas, tornando assim as células mais impermeáveis ao cristal violeta-iodo. Ao contrário, nas bactérias gram-negativas, o álcool dissolve a membrana externa, fazendo com que o corante violeta-iodo entre dentro da membrana, e aí as bactérias gram-negativas ficam incolores com a lavagem de álcool, e com a adição do corante **safarina** torna as células cor-de-rosa/avermelhada.



CARACTERÍSTICAS	GRAM-POSITIVA	GRAM-NEGATIVA
REAÇÃO DE GRAM	RETÉM O CORANTE VIOLETA DE GENCIANA E CORA-SE DE VIOLETA ESCURO OU PÚRPURA.	PODE SER DESCORADO PARA ACEITAR CONTRACORANTE (SAFARINA) E CORA-SE DE VERMELHO.
CAMADA DE PEPTIDEOGLICANA	ESPESSA (MÚLTIPLAS CAMADAS)	FINA (CAMADA ÚNICA)
ÁCIDOS TEICÓICOS	PRESENTES EM MUITAS	AUSENTES
ESPAÇO PERIPLÁSMICO	AUSENTE	PRESENTE
MEMBRANA EXTERNA	AUSENTE	PRESENTE
CONTEÚDO DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	NENHUM	ALTO
CONTEÚDO DE LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	BAIXO (AS BACTÉRIAS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES POSSUEM LIPÍDEOS UNIDOS À PEPETIDEOGLICANA)	ALTO (DEVIDO À PRESENÇA DA MEMBRANA EXTERNA)
RESISTÊNCIA À RUPTURA FÍSICA	ALTA	BAIXA
INIBIÇÃO POR CORANTES BÁSICOS	ALTA	BAIXA

Vamos falar detalhadamente como é feito o processo da coloração de Gram.

Procedimento da coloração de Gram:

1. Coloca-se sobre o esfregaço realizado um **corante básico** púrpura, normalmente é o corante violeta de **genciana**, essa etapa constitui a coloração primária;

2. Após um minuto, lavar rapidamente com água destilada;

3. Cobrir a lâmina com solução de **lugol (iodo)** por um minuto;

4. Após um minuto, lavar em água destilada;

5. Após a lavagem, lavar a lâmina com **álcool-acetona ou álcool absoluto** por 15 segundos, e em seguida lavar com água correte;

6. Em seguida, cobrir a lâmina com **fucsina de gram ou safarina** e aguardar por 30 segundos;

7. Após essa etapa, lavar a lâmina com água destilada e deixar secar;

(AOCP - EBSERH/HC-UFG – 2015). Para executar a coloração de Gram, utiliza-se, respectivamente, os seguintes componentes:

A) violeta de metila, lugol, álcool-cetona e Giemsa.
B) violeta de metila, lugol, azul de metileno, e safranina.
C) iodo, álcool-cetona e safranina.
D) giemsa, lugol, álcool-cetona e safranina.
E) cristal violeta, lugol, álcool-cetona e safranina.

Comentário: Moleza né!? O protocolo de coloração pelo método de gram segue a seguinte sequência: cristal violeta, lugol, álcool-acetona e safranina (ou fucsina). **Resposta: Letra E.**

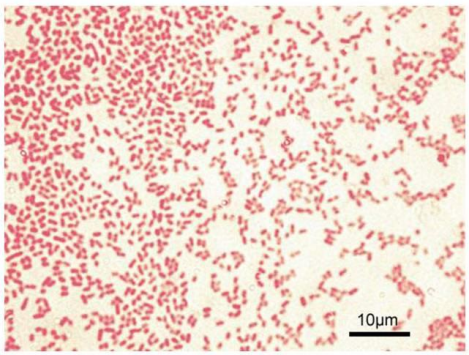
O que acontece no processo de coloração de Gram?

Quando utilizamos o corante violeta de genciana e depois lavamos com a solução de iodo (lugol), forma-se **um complexo entre os dois de coloração escura, chamado iodopararosanilina**. Esse complexo é fortemente retido nas bactérias **Gram-Positivas** e o álcool não consegue remover esse complexo, já nas bactérias **Gram-negativas**, esse complexo é removido pelo álcool. Quando realizamos a segunda coloração, com safarina ou fucsina, as **bactérias Gram-Negativas apresentarão coloração avermelhada**, porque elas retêm o contracorante, enquanto as **Gram-Positivas apresentam coloração roxa, porque elas conservam o primeiro corante.**

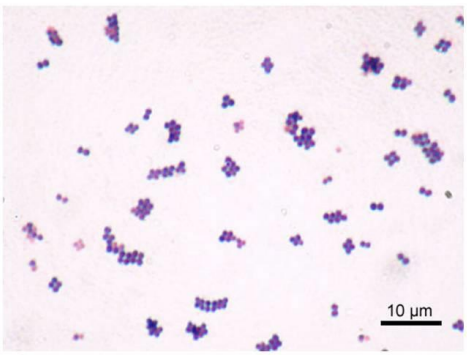
Esquema da coloração de Gram



Visualização das bactérias no microscópio após a coloração de Gram



Gram negativas



Gram positivas

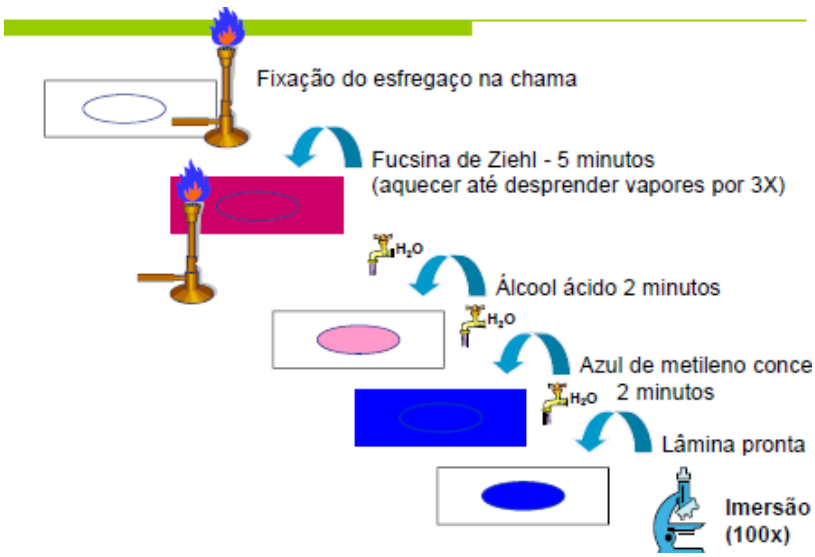
3 – COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Outro tipo de coloração utilizada na prática clínica foi desenvolvida pelo bacteriologista Franz Ziehl e pelo patologista alemão Friedrich Carl Adolf Neelsen, em 1882. Eles se basearam nas propriedades que alguns gêneros bacterianos apresentam de **resistir ao descoramento** feito por uma solução álcool-ácido, que fazem com que essas bactérias permaneçam coradas de vermelho depois de serem tratadas com fucsina. Chamamos essas bactérias de Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente – BAAR). Elas se diferem das outras bactérias que retém a cor do corante de fundo.

Procedimento da coloração de Ziehl-Neelsen:

1. Cobrir o esfregaço com solução de fucsina de Ziehl e deixar agir por 5-10min, aquecendo com chama branda, até observar o desprendimento de vapores.
2. Lavar com água corrente e descorar com solução de álcool-ácido clorídrico a 1%.
3. Cobrir o esfregaço com azul de metileno, por aproximadamente 30 segundos.
4. Lavar e deixar secar.

Esquema da coloração de Ziehl-Neelsen



Pronto! Estudamos os principais métodos de coloração bacteriana! Porém existem ainda outras colorações um pouco menos utilizadas...

4– OUTRAS COLORAÇÕES

- Coloração de Albert-Laybourn:

É um método diferencial recomendado para a pesquisa de **granulações metacromáticas de *Corynebacterium***, principalmente *Corynebacterium diphtherie.* As granulações se coram em azul e a bactéria em verde. Trata-se de um diagnóstico presuntivo e não um diagnóstico definitivo para **difteria**.
Pesquisa em amostras de nasofaringe e orofaringe.

PASSO A PASSO:
Cobrir o esfregaço com a solução de Albert-Laybourn e deixar por 5 min.
Lavar com água corrente.
Cobrir lâmina com lugol (duplamente concentrado) e deixar por 1 min.
Lavar com água corrente
Secar ao ar e ficar no calor.
Observar em microscópio na objetiva de imersão.

- Coloração de Fontana-Tribondeau:

Utilizado para a pesquisa de espiroquetas em material de lesão genital (na fase primária da sífilis). As espiroquetas se impregnam pela prata quando tratadas com solução nitrato de prata.

PASSO A PASSO:
Cobrir o esfregaço com solução de Ruge e deixar por 1 min.
Lavar com água corrente.
Cobrir a lâmina com Fontana I e aquecer por 1 min até a formação de vapores.
Lavar bem com água corrente

Cobri com a Fontana II (solução de nitrato de prata) e aquecer por 4 min na chama de Bico de Bunsen
Lavar bem com água corrente
Secar ao ar e observar em objetiva de imersão.

- Microscopia de Campo Escuro:

Utilizada para a pesquisa de espiroquetas em diversos materiais de análise, com o auxílio de microscópio com condensador de campo escuro. Útil para a pesquisa da bactéria causadora da **Sífilis (*Treponema pallidum*),** entretanto também para pesquisa da bactéria causadora da **leptospirose (*Leptospita spp.*) e cancro mole (*Haemophilus ducreyi*).**

PASSO A PASSO:
Após limpeza da lesão, escarificar com alça bacteriológica ou irritar a lesão com éter.
Adicionar uma gota de solução fisiológica estéril sobre a área escarificada.
Aguardar 1 min.
Com auxílio da alça bacteriológica estéril, retirar o liquido seroso e depositar em lâmina limpa.
Cobrir com lamínula, vedar com parafina ou esmalte.

Posteriormente pesquisar estruturas espiraladas no microscópio com lente do condensador de campo escuro.

- Coloração de Auramina e Rodamina:

Coloração utilizada para visualização de bacilos álcool-ácido resistentes. Os ácidos micólicos presentes na parede celular das micobactérias têm afinidade pelos fluorocromos auramina e rodamina. As micobactérias são visualizadas em amarelo-alaranjado brilhante em contraste com o fundo verde-escuro. Necessário o microscópio de fluorescência para leitura.

PASSO A PASSO:

Cobrir o esfregaço com o corante auramina.
Deixar por 15 min.
Lavar com água corrente e retirar o excesso.
Cobrir a lâmina com álcool-ácido e deixar por 2 min.
Lavar com água e retirar o excesso.
Secar ao ar e não utilizar papel filtro.

Examinar imediatamente em microscópio de fluorescência. Se a lâmina não for lida imediatamente, manter as lâminas no escuro e refrigeradas de 2 a 8ºC.

PROVAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Para manter um controle de qualidade dentro do laboratório microbiológico, utilizamos algumas cepas padrão que indicaram se o meio de cultura está gerando os resultados esperados. Essas cepas apresentam respostas conhecidas a uma série de provas laboratoriais. As principais cepas utilizadas são ATCC (American Type Culture Collection). Alguns exemplos de cepas utilizadas são:

- *E. coli* ATCC 25922: Cepa não produtora de beta-lactamase; Utilizada para testes de sensibilidade para painéis de gram-negativos;
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883: produz um grande número de provas positivas para controle de painéis de gram-negativos;
- *Pseudomonas aeruginosas* ATCC 27853: são cepas sensíveis aos agentes anti-pseudomonas, utilizadas para testes de crescimento de enterobactérias;

- *Enterococcus fecalis* ATCC 51299: cepas sensíveis à ampicilina, vancomicina e aminoglicosídeos de alto nível; utilizadas para testes automatizados de identificação e sensibilidade para painéis de gram-positivos;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25927: cepas não produtoras de beta-lactamase para testes de identificação de Staphylococcus sp. e Enterococcus sp.;

E assim, encerramos nossa primeira aula! Agora vamos colocar em prática o que nós aprendemos sobre o conteúdo.

Aguardo vocês na nossa próxima aula.

Abraços,

Professora Thaiana Cirqueira

QUESTÕES COMENTADAS

(CESPE – EBSERH – Biomédico – 2018). 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.

Comentário: Para o preparo do meio de cultura ágar chocolate, meio base (TSA ou ágar GC ou ágar Mueller-Hinton), geralmente sangue de carneiro, mas também pode ser de cavalo ou coelho, suplementos VX (vendidos comercialmente). Após a autoclavagem do meio base, adiciona-se 10% de sangue de carneiro do total do litro de meio base, homogeneiza em fogo até a lise das hemácias que darão a cor achocolatada do meio. **Resposta: Certo**.

(IBFC – EBSERH – Biomédico – 2017). Assinale a alternativa correta. O meio de cultura utilizado em laboratórios de microbiologia que é rico e superior a outros meios de cultivo destinados para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, pois contém em sua fórmula antibióticos que inibem o crescimento de *Neisserias* saprófitas e outras bactérias, quando em amostras colhidas de sítios contaminados, denomina-se:

A) Ágar MacConkey
B) Ágar Cled
C) Ágar Thayer-Martin Chocolate
D) Löwenstein Jensen
E) Middlebrook Enrichment

Comentário: O Ágar Thayer-Martin Chocolate é um meio seletivo utilizado para isolamento de *Neisseria gonorrhoeae e neisseria meningitidis*, esse meio tem a capacidade de inibir a maioria das outras bactérias. **Resposta: Letra C**.

(IBFC – EBSERH – Biomédico – 2016). No preparo dos meios de cultura no laboratório de microbiologia deve-se controlar:

A) A presença de filamentos ou células
B) O cheiro e as características das colônias após crescimento
C) A esterilidade e as propriedades de crescimento
D) O aspecto geral do meio após a preparação
E) A coloração dos meios após a preparação

Comentário: Os meios de cultura devem fornecer um conjunto de nutrientes na quantidade adequada para a manutenção dos microrganismos simulando o ambiente original, além disso, todos os meios preparados devem ser submetidos a esterilização, e, posteriormente ao controle de qualidade afim de garantir que microrganismos contaminantes não irão interferir na realização dos exames microbiológicos. **Resposta: Letra C.**

(AOCP - EBSERH/CH-UFPA – Biomédico – 2016). O crescimento de microrganismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a 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 muito utilizado é o ágar sangue (AS). Qual é sua principal finalidade?

(A) Isolamento de microrganismos não fastidiosos, verificação de hemólise dos Streptococcus spp. e Staphylococcus spp. e usado na prova de satelitismo (para identificação presuntiva de Haemophilus spp.).

(B) Análise de água, alimentos e leite como meio para cultivo preliminar das amostras submetidas a exames bacteriológicos e isolamento de organismos para culturas puras, conservação e manutenção de culturas em temperatura ambiente, como método opcional para os laboratórios que não dispõem do método da criopreservação (congelamento das cepas em freezer à - 70ºC) e observação da esporulação de espécies de bacilos Gram-positivos.

(C) Crescimento de microrganismos exigentes Haemophilus spp., Neisseria spp. Branhamellacatarrhalis e Moraxella spp.

(D) Isolar bacilos Gram-negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose.

(E) Selecionar e isolar espécies de Salmonella e Shigella, em amostras de fezes, alimentos e água.

Comentário: O ágar sangue é um meio não seletivo e diferencial que permite o crescimento de gram positivas e negativas, além de permitir a visualização de hemólise. Ou seja, esse meio é utilizado para Usado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos, verificação de hemólise dos *Streptococcus spp*. e *Staphylococcusspp,* e usado na prova de satelitismo (teste para identificação presuntiva de *Haemophilusspp*).

Resposta: Letra A.

(IDECAN Farmacêutico - Bioquímico - Pref. Simonésia/MG – 2016). "O crescimento dos micro-organismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a sua identificação. É importante conhecer o potencial de crescimento de cada meio de cultura e adequar ao perfil bacteriano esperado para cada material." (Preparo de materiais em microbiologia; Meios de cultura usados no laboratório; Técnicas de semeadura e colorações. Luciana Debortoli de Carvalho.) Relacione adequadamente o meio de cultura ao tipo de bactéria.

1. Ágar-Chocolate.
2. Caldo tioglicolato com indicador.
3. Caldo tioglicolato sem indicador.
4. Ágar-MacConkey.
5. Ágar-Manitol.

( ) Diferencial para espécies fermentadoras da lactose.
( ) Moraxella spp.
( ) Micro-organismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios.
( ) Diferencial para Staphylococcus aureus.
( ) Micro-organismos anaeróbios.

A sequência está correta em

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

Comentário: Como vimos acima, o agar chocolate "**favorece o crescimento da maioria das bactérias**, incluindo algumas que não crescem em Agar sangue", então não pode ser considerado um meio diferencial. O tioglicolato com indicador é utilizado para "avaliar a **presença de bactérias aeróbias", e** além dos **aeróbios**, avalia a presença de **microaerófilos** e **anaeróbios,** enquanto o tioglicolato sem indicador é "usado para cultivo de microrganismos **anaeróbios**". O Agar-MacConkey é "meio seletivo para bactérias **Gram-negativas** e diferencial para **bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose".** E o manitol é "meio **seletivo** usado para o

isolamento de **estafilococos patogênicos**, e o principal patógeno isolado nesse meio é o ***S. aureus***. **Resposta: Letra D.**

(COTEC/UNIMONTES - Biomédico - Pref. Guaraciama/MG – 2016). Meio rico e não seletivo, diferencial para a hemólise, nele crescem a maioria dos Gram negativo e Gram positivo, além de fungos filamentosos (bolores) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros fastidiosos. A descrição do quadro acima está mais bem relacionada com qual meio de cultura abaixo?

A) Ágar chocolate.

B) Ágar sangue.

C) Ágar CLED.

D)Ágar Sabouraud.

Comentário: O Ágar Sangue é aquele meio utilizado para a diferenciação de *Streptococcus spp*. e *Staphylococcus spp*. pela formação de halos de hemólise nítidos. Além disso, nesse meio podem ser adicionados outros suplementos que irão permitir alcançar um maior leque de microrganismos. **Resposta: Letra B.**

(FUNCAB - Biomédico - Pref. Anápolis/GO – 2016). Durante a rotina bacteriológica, vários meios podem ser utilizados dependendo do tipo de microrganismo a ser pesquisado. Observe as características a seguir:

I. Fornece fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas.

II. Meio para cultivo de estreptococos, meningococos, penumococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.

III. É um meio derivado de nutrientes de cérebro, coração peptona e dextrose.

Essas características são referentes a qual meio de cultura?

A) Caldo BHI

B) Caldo selenito

C) Ágar CLED

D) Ágar sangue

E) Ágar Chocolate

Comentário: Vamos recordar a nossa aula: "Caldo BHI (Brain Heart Infusion): é composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, peptona e dextrose, **são utilizados para cultivo de estreptococcos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos**". **Resposta: Letra A.**

(MAKIYAMA - Biomédico - Pref. Natal/RN – 2016). A respeito da coloração bacteriana de Gram:

A) As bactérias que possuem a camada de lipídios associados a polissacarídeos não são coradas pela coloração de Gram.

B) Escherichia coli e Staphylococcus aureus são bactérias Gram-negativas.

C) Bactérias Gram negativas são aquelas que apresentam uma camada lipídica não corada pelo corante devido à afinidade entre a pigmentação e a camada de fosfolipídeos.

D) As bactérias Gram-positivas têm parede celular espessa e única de peptidoglicanos, que, ao contato com a coloração de Gram, adquire cor púrpura ou azul.

Comentário: O que caracteriza as bactérias é a composição da parede celular. "Gram-positivas: A parede celular das bactérias gram-positivas consiste **de muitas camadas de peptideoglicano que formam uma estrutura espessa e rígida.** Além dos peptideoglicanos, a parede celular das gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem basicamente em um álcool (glicerol ou ribitol) e fosfato;". **Resposta: Letra D.**

(UFT/COPESE- Biomédico - Pref. Guaraí/TO- 2016). "A Grã-Bretanha e a Ásia estão enfrentando um surto de escarlatina que intriga especialistas. De acordo com a Autoridade de Saúde Pública da Inglaterra (PHE, na sigla em inglês), em 2015, foram registrados 17.586 casos da infecção no país – o número só não ultrapassa os registros de 1967, com 19.305 notificações. A escarlatina é uma infecção bacteriana, causada por estreptococos do grupo A, que atinge principalmente crianças com idades entre 5 e 12 anos." Fonte: Adaptado de VEJA.com/Divulgação (21/03/2016). Referente às características das bactérias, é CORRETO afirmar que:

(A) A diferenciação entre as bactérias é realizada exclusivamente pelas suas características morfológicas.
(B) Os aspectos microscópicos, incluindo o tamanho, forma e os arranjos dos organismos (cocos, bastonetes, curvos ou espiralados), determinam a capacidade das bactérias de resistir a certos antibióticos.
(C) Coloração de Gram é um teste rápido que permite aos clínicos a diferenciação entre as duas mais importantes classes de bactérias.
(D) As bactérias Gram negativas têm a camada de peptidoglicano espessa contendo ácido teicoico e ácidos lipoteicoicos.

Comentário: Abordamos esse assunto no tópico sobre coloração: "A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, daí o nome coloração de Gram . Esse método as bactérias em dois grandes grupos: **as bactérias gram-negativas e as bactérias gram-positivas**". **Resposta: Letra C.**

(AOCP - EBSERH/CH-UFPA – Biomédico – 2016). Um aluno de Biomedicina realizou a coloração de Gram, que é um método para corar lâminas de vários materiais biológicos na identificação de bactérias. Observou ao final do método que trocou a ordem dos corantes, colocando primeiro a fucsina, em seguida o lugol, depois o descorante e por último o cristal violeta. Nesse caso, o que irá acontecer?
(A) As bactérias gram negativas ficarão coradas de roxo.
(B) As bactérias gram positivas ficarão coradas de roxo.
(C) As bactérias gram negativas ficarão coradas em rosa.
(D) As bactérias gram positivas não irão corar.
(E) Ele não conseguirá visualizar nada na lâmina, pois não haverá nenhuma bactéria corada.

Comentário: O correto seria primeiramente corar com o cristal violeta, posteriormente colocar o lugol que é um fixador, posteriormente utilizar o descorante para que aquelas gram-negativas se descorassem e ao ser colocado em contato com a fucsina se corassem de rosa. Como a ordem foi trocada, todas as bactérias estariam coradas inclusive as gram negativas estariam em uma coloração roxa. **Resposta: Letra A.**

(IDECAN Farmacêutico - Bioquímico - Pref. Simonésia/MG 2016). Sobre a técnica de coloração de Gram, assinale a alternativa correta.

A) Os micro-organismos são expostos a uma coloração a quente com carbolfucsina concentrada por 5 minutos.

B) Bactérias Gram-negativas não perdem o corante violeta durante a descoloração e, por isso, adquirem coloração rosa.

C) Bactérias Gram-positivas retêm o corante violeta por resistirem à descoloração e ficam coradas em azul escuro / roxo.

D) Bactérias Gram-positivas perdem o corante violeta durante a descoloração e adquirem a coloração azul escuro / roxo.

Comentário: "Quando utilizamos o corante violeta de genciana e depois lavamos com a solução de iodo (lugol), forma-se **um complexo entre os dois de coloração escura, chamado iodopararosanilina**. Esse complexo é fortemente retido nas bactérias **Gram-Positivas** e o álcool não consegue remover esse complexo, já nas bactérias" Como vimos na nossa aula, as bactérias gram-positivas possuem uma parede celular que consiste em muitas camadas de peptideoglicano, formando uma parede espessa e rígida, fazendo com que o corante violeta de genciana fique retido e não sofra descoloração, por isso ela apresenta coloração **roxa/azul escur. Resposta: Letra C.**

(COVEST - Biomédico – UFPE – 2015). Um estagiário do laboratório de Microbiologia Clínica recebeu uma lâmina contendo esfregaço de *Escherichia coli* e uma lâmina contendo esfregaço de Staphylococcus aureus para serem coradas pela coloração de Gram (cristal violeta, lugol, álcool, fucsina diluída). Após fixar os esfregaços pelo calor, o estagiário realizou a coloração, porém inverteu a ordem da utilização dos corantes (fucsina, álcool diluído, cristal violeta, lugol). Qual foi o resultado da coloração observado ao microscópio para E. coli e S. aureus, respectivamente?

A) Bacilos vermelho claros e cocos vermelho-escuros.

B) Bacilos vermelho-claros e bacilos violeta-escuros.

C) Bacilos e cocos vermelho-claros.

D) Bacilos e cocos violeta-escuros.

E) Cocos vermelho-claros e cocos violeta-escuros.

Comentário: A E. coli é um bacilo gram-negativo, ao analisarmos essa cepa no microscópio, ela irá apresentar a forma bacilar e por ser um microrganismos gram-negativo deverá apresentar coloração **avermelhada/vermelho claro**. Já o S. aureus, é uma bactéria do grupo cocos gram-positivo, ou seja, apresentaram forma de **cocos** (ou cachos de uva) e coloração **vermelho-escuro/roxo/azul-escuro. Porém, quando o estagiário inverteu a ordem dos corantes, não será possível observar a cor vermelho claro, já que esse corante não será fixado. Resposta: Letra D.**

(COVEST - Biomédico – UFPE – 2015). A técnica de coloração diferencial mais importante em bacteriologia é o método de Gram. Este método explora o fato de células com propriedades diferentes apresentarem coloração diferente. Assim, as bactérias podem se comportar como Gram-positivas ou como Gram-negativas. Nesse contexto, analise as afirmativas abaixo.

1) A camada de peptideoglicano é muito mais espessa nas bactérias Gram-positivas, e essas bactérias podem possuir uma camada de ácido teicoico.

2) Os micro-organismos Gram-negativos possuem uma camada externa composta de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios.

3) Apenas os micro-organismos Gram-positivos têm uma membrana externa contendo endotoxina (lipopolissacarídeo).

4) Os micro-organismos Gram-positivos e os Gram-negativos contêm peptideoglicano; contudo, nos primeiros, a parede é única e fina e nos segundos a parede é múltipla e espessa. Estão corretas, apenas:

A) 1 e 4.

B) 1 e 3.

C) 2 e 3.

D) 3 e 4.

E) 1 e 2.

Comentário: "Gram-positivas: A parede celular das bactérias gram-positivas consiste de muitas camadas de peptideoglicano que formam

uma estrutura espessa e rígida. Além dos peptideoglicanos, a parede celular das gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem basicamente em um álcool (glicerol ou ribitol) e fosfato;

Gram-negativas: Em contraste, a parede celular das bactérias gram-negativas contém somente uma camada fina de peptideoglicano, mas apresentam uma membrana externa lipídica que não está presente nas gram-positivas. E diferente das gram-positivas, na parede celular das gram-negativas não contêm ácidos teóicos;".

Resposta: Letra E.

(AOCP - Biomédico - EBSERH/HC-UFG – 2015). "As bactérias são classificadas de acordo com sua morfologia, estrutura, atividade metabólica e fatores ambientais necessários à sobrevivência" (ARAÚJO et al, 2010). Em relação às bactérias, é correto afirmar que

(A) as bactérias gram-negativas possuem espessa camada que é firmemente aderida à carioteca de sua própria célula.

(B) certos organismos gram-positivos e gramnegativos podem apresentar também uma cápsula, ou camada de glicocálice, internamente à parede celular. Essa cápsula torna a bactéria vulnerável à fagocitose por monócitos, podendo dificultar sua fixação tecidos do hospedeiro.

(C) os organismos gram-positivos são assim denominados devido às características de coloração próprias da sua finíssima camada externa de peptidoglicano, além disso, esses micro-organismos possuem amplo complexo de Golgi e mitocôndrias em seu interior.

(D) as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas em função da diferença na arquitetura da parede celular. A parede celular Gram-positiva consiste de uma camada espessa de peptidoglicano (~30 nm), enquanto a parede celular da Gram-negativa apresenta camada mais fina de peptidoglicano (~10nm) e sua estrutura e composição da membrana mais complexas.

(E) bactérias como as microbactérias têm glicolipídeos múltiplos que lhes conferem uma aparência de bolor, acarretando desvantagens biológicas, impedindo a infecção ao hospedeiro.

Comentário: Mesma justificativa da questão anterior, as bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas se diferenciam pela sua parede celular.

"Gram-positivas: A parede celular das bactérias gram-positivas consiste de muitas camadas de peptideoglicano que formam uma estrutura espessa e rígida. Além dos peptideoglicanos, a parede celular das gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem basicamente em um álcool (glicerol ou ribitol) e fosfato; **Gram-negativas:** Em contraste, a parede celular das bactérias gram-negativas contém somente uma camada fina de peptideoglicano, mas apresentam uma membrana externa lipídica que não está presente nas gram-positivas. E diferente das gram-positivas, na parede celular das gram-negativas não contêm ácidos teóicos;". **Resposta: Letra D.**

(FAFIPA - Serviço de Biomedicina - Pref. Londrina/PR – 2015). A coleta de materiais biológicos para exames de microbiologia deve seguir as seguintes recomendações:

(A) Identificar o material do paciente adequadamente.

(B) Informar dificuldades que possam ocorrer durante a coleta, como material insuficiente para análise adequada.

(C) Informar sobre o uso de antimicrobianos prévios à coleta do material pelo paciente.

(D) No geral, os procedimentos de coleta seguem protocolos específicos que facilitam o cultivo dos micro-organismos suspeitos, de acordo com o sítio a ser investigado.

(E) Todas estão corretas.

Comentário: A questão descreve corretamente a ordem que deve ser seguida para a coleta de materiais biológicos para exames de microbiologia.

- A coleta deve sempre ser realizada previamente à introdução de terapia antimicrobiana ou de sua modificação, pois estas interferem na viabilidade das bactérias para a cultura microbiológica;
- O volume de amostra interfere na sensibilidade dos testes microbiológicos e deve ser suficiente para a execução dos diversos procedimentos solicitados. Amostras insuficientes podem levar a resultados falso-negativos;
- Informar claramente ao paciente os procedimentos necessários à coleta da amostra microbiológica;

- A identificação correta da amostra, assim como o sítio de origem e a suspeita clínica são informações importantes que devem constar na requisição para que o microbiologista clínico possa executar os procedimentos recomendados e utilizar os meios de cultura adequados. **Resposta: Letra E.**

(AOCP - EBSERH/HDT-UFT- 2015). Um paciente está apresentando sintomas de hanseníase. Para confirmar o diagnóstico, um técnico deve realizar uma coloração específica para a bactéria causadora da hanseníase. Qual coloração é essa?

A) De campo escuro.
B) Giemsa.
C) Ziehl-Neelsen
D) Tinta da china.
E) Hematoxilina e eosina.

Comentário: O bacilo de Hansen é um bacilo álcool ácido resistente, e a técnica apropriada para detecção deste tipo de bactérias é a coloração de Ziehl-Neelsen como vimos na aula. **Resposta: Letra C.**

(FAFIPA - Serviço de Biomedicina - Pref. Londrina/PR – 2015).
Sobre o método de Ziehl-Nielsen para bacterioscopia direta, pode-se afirmar que:
(A) Esta metodologia categoriza as bactérias em álcool-ácido-resistentes e não álcool-ácido resistentes.
(B) O corante empregado é o Albert-Layborn, capaz de penetrar no interior do Mycobacterium tuberculosis.
(C) É sempre utilizada em associação com o método de impregnação em prata.
(D) Deve ser confirmado por microscopia de campo escuro ou pelo método de tinta nanquim.
(E) Utiliza um corante que pode se tornar fluorescente na microscopia óptica.

Comentário: "Eles se basearam nas propriedades que alguns gêneros bacterianos apresentam de **resistir ao descoramento** feito por uma solução álcool-ácido, que fazem com que essas bactérias permaneçam coradas de vermelho depois de serem

tratadas com fucsina. Chamamos essas bactérias de Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente – BAAR)". **Resposta: Letra A.**

(AOCP - PREFEITURA MUNICIPAL DO JABOATÃO DOS GUARARAPES ESTADO DO PERNAMBUCO - Bioquímico – 2015). As culturas são feitas pela semeadura dos materiais clínicos em meios sólidos, distribuídos em placas de Petri, ou em meios líquidos, distribuídos em tubos de ensaio ou em outros tipos de frascos. A respeito da realização das culturas, assinale a alternativa correta.

(A) Os meios líquidos são utilizados como meio de enriquecimento ou quando é grande o volume do material clínico a ser semeado.

(B) Uma vez semeados, todos os meios devem ser incubados em temperatura acima de 45 ºC.

(C) A atmosfera isenta de O2 é a atmosfera necessária para o crescimento de microrganismos aeróbios.

(D) Quando se deseja obter um ambiente rico em O2 para o crescimento de bactérias, deve se acender uma vela no fundo de uma jarra, fechando-se hermeticamente essa jarra.

(E) Os meios de cultura não devem ser preparados no próprio laboratório.

Comentário: A temperatura de incubação varia conforme o microorganismo que deseja crescimento. A atmosfera isenta de O2 é adequada para crescimento de microrganismos anaeróbios. Quando se deseja um ambiente pobre em O2 deve se acender uma vela no fundo da jarra. Os meios de cultura podem ser preparados no próprio laboratório. **Resposta: Letra A.**

(FAFIPA - Serviço de Biomedicina - Pref. Londrina/PR – 2015). O ágar Mueller-Hinton é o meio de escolha para realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, pois:

(A) Demonstra reprodutibilidade reduzida entre os diferentes lotes nos testes de sensibilidade.

(B) Permite crescimento satisfatório dos patógenos não fastidiosos.

(C) Existe falta de dados e experiência relativos a testes de sensibilidade realizados com esse meio.
(D) Apresenta elevado custo.
(E) Nunca apresenta contaminações exógenas.

Comentário: "Agar Mueller-Hinton: **meio utilizado para teste rotineiro de suscetibilidade das bactérias.** A sua composição é de extratos de carne e caseína, sais, cátions divalentes e amido solúvel". O agar mueller-hinton é utilizado para o crescimento de diversas bactérias, principalmente aquelas que não exigem muitos suprimentos para crescer. **Resposta: Letra B.**

(COMPERVE – UFRN- 2015). Meios de cultura consistem na associação de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos fora do seu meio natural. Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos microrganismos, existem vários tipos de meios de cultura para satisfazerem as variadas exigências nutricionais.
Sobre os meios de cultura é correto afirmar:
a) Os meios de enriquecimento contêm substâncias que inibem o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos, favorecendo o crescimento de outros.
b) Os meios seletivos proporcionam nutrientes adequados ao crescimento de microrganismos presentes usualmente em baixos números ou de crescimento lento, bem como microrganismos exigentes e fastidiosos.
c) Os meios diferenciais contêm substâncias que permitem estabelecer diferenças entre microrganismos muito parecidos.
d) Os meios de dosagem prestam-se para a realização de provas bioquímicas e para a verificação de funções fisiológicas de organismos submetidos à identificação.
Comentário:
a) São aqueles meios líquidos ricos em nutrientes que permitem que as bactérias contidas na amostra coletada cresçam quantitativamente. São meios que estimulam o crescimento de determinados microrganismos, mas não contêm substancias que inibem.

b) são aqueles que permitem selecionar e isolar organismos específicos que estão misturados com outros em uma mesma amostra, através da adição de inibidores que irão impedir o crescimento de organismos não desejados e favorecer o crescimento daqueles organismos que se deseja isolar.
c) são meios que devido a adição de alguns reagentes ou substâncias resultam em um tipo de crescimento ou reação específica, o que permite estabelecer diferenças entre microrganismos muito parecidos.
d) empregado nas determinações de vitaminas, antibióticos e aminoácidos.

Resposta: Letra C.

(AOCP - Biomédico - EBSERH/HU-UFJF – 2015). Quais são os principais componentes de um meio de cultura?
(A) Energia, oxigênio, elastina e colágeno.
(B) Fósforo, queratina, glúten e carbono.
(C) Fontes de carbono, açúcares, nitrogênio, fósforo e sais minerais.
(D) Sais minerais, oxigênio, elastina e carbono.
(E) Fontes de carbono, energia, colágeno e elastina.

Comentário: Como vimos na nossa aula os meios de cultura são compostos por diversas substâncias que favorecem o crescimento microbiano, pois é suporte de nutrientes para os microrganismos, "**como fonte de carbono e nitrogênio, fonte de energia, sais minerais, fatores de crescimento**, condições físicas (pH, temperatura, pressão osmótica), e condições ambientais favoráveis (ambiente estéril)".
Resposta: Letra C.

(CESPE – FUB – 2014). O meio de Cary Blair é um meio seletivo rico em fontes de nitrogênio e adequado para isolamento de *Neisseria meningitidis*.

Comentário: Aprendemos que o meio de Cary Blair não é um meio seletivo e sim um meio de transporte. **Resposta: Errado**.

(CESPE – FUB – 2014). A coprocultura é adequadamente transportada em meio MacConkey e deve ser semeada com alça em meio salina tamponada.

Comentário: O meio de transporte indicado para transportar amostra de fezes é o meio de Cary Blair. Já o meio MacConkey é um meio seletivo para enterobactérias destinado à detecção, isolamento, contagem de coliformes e patógenos intestinais. **Resposta: Errado.**

(CESPE – UNIPAMPA – FARMACÊUTICO/BIOQUÍMICO – 2013). Julgue os próximos itens, que versam sobre meios de cultura.
A composição do meio de cultura independe da exigência nutricional do microrganismo.

Comentário: A composição química é extremamente importante para o crescimento do microrganismo que se deseja isolar. **Resposta: Errado.**

(CESPE- UNIPAMPA – 2013). Julgue os próximos itens, que versam sobre meios de cultura. Meios de cultura ou meios de cultivo podem ser definidos como qualquer substância química ou biológica utilizada para a manutenção de microrganismos vivos.

Comentário: Os meios de culturas são preparações químicas que possuem na sua formula nutrientes e entre outras substâncias que provém condições necessárias para que os micro-organismos inoculados multipliquem-se em um meio artificial. **Resposta: Certo.**

(CESPE – Farmacêutico/Bioquímico – 2013). Julgue os próximos itens, que versam sobre meios de cultura. O meio de cultura de enriquecimento é aquele que contém um agente redutor (tioglicolato ou cisteína), previne a desidratação e mantém o pH favorável.

Comentário: A questão definiu o meio de transporte, que mantém o pH favorável e previne a desidratação para manter as condições necessárias para o crescimento da bactéria desejada. **Resposta: Errado.**

(CESPE – 2013 – FARMACÊUTICO-BIOQUÍMICO - UNIPAMPA - 2013)
Com relação aos exames de diagnóstico em microbiologia, julgue os itens que se seguem.
Considere que, na análise de determinados microrganismos, sejam visualizadas, após coloração pelo método de gram, bactérias de morfologia esférica, agrupadas em forma de corrente, de cor roxa ao microscópio. Nesse caso, os microrganismos analisados são estafilococos gram-negativos.

Comentário: Nesse caso, os microrganismos analisados são estafilococos gram-positivos, pois apresentam coloração roxa ao microscópio. **Resposta: Errado.**

(IBFC – EBSERH – Biomédico – 2013). Faça a associação correta entre os meios de cultura e suas características:

A) Agar Mac Conkey.
B) Agar Cled.
C) Agar Chocolate.

1 - Usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras de urina.
2 - À base do meio é adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho em temperatura alta, o que faz com que as hemácias lisem, liberando hemina e hematina, compostos fundamentais para o crescimento dos microrganismos exigentes.
3 - O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos especialmente enterococos e estafilococos.

A) A1, B2, C3
B) A2; B3; C1
C) A3; B1; C2
D) A3; B2; C1

Comentário:

1- Ágar CLED é usado para isolamento e quantificação de microorganismos presentes em amostras de urina. A presença de eletrólitros inibe o véu de cepas de Proteus spp.
2- Ágar chocolate é um meio nutritivo que permite o crescimento da maioria das bactérias, especialmente as bactérias fastidiosas, em sua composição utiliza-se sangue de cavalo, carneiro ou coelho para o crescimento dos microrganismos mais exigentes.
3- Ágar Mac Conkey tem por finalidade isolar bacilos gram-negativos e verificar a fermentação ou não da lactose. Inibe o crescimento de gram-positivos através dos cristais violeta que fazem parte do meio de cultura.

Resposta: Letra C.

(FIOCRUZ – FGV – 2010). Assinale a alternativa que apresente a sequência correta para se obter a coloração de Ziehl-Neelsen.

a) Adicionar fuccina, aquecer por cinco minutos até sair vapor, escorrer o corante, adicionar álcool-clorídrico, lavar com água, corar com azul de metileno, lavar e secar.

b) Adicionar fuccina, aquecer até sair vapor, escorrer o corante, adicionar álcool, lavar com água, corar com azul de metileno, lavar e secar.

c) Adicionar fuccina, aquecer até sair vapor, escorrer o corante, adicionar álcool-clorídrico deixando por um minuto, lavar com água, corar com azul de metileno, lavar e secar.

d) Adicionar fuccina, aquecer por cinco minutos até sair vapor, escorrer o corante, adicionar ácido clorídrico, lavar com água, corar com azul de metileno, lavar e secar.

e) Adicionar fuccina, aquecer por cinco minutos até sair vapor, escorrer o corante, adicionar álcool-clorídrico, lavar com água, corar com cristal violeta, lavar e secar.

Comentário: Como o procedimento descrito acima, a resposta correta é a letra A.
Resposta: A.

(CESPE – HEMOBRÁS – ESPECIALISTA EM PRODUÇÃO DE HEMODERIVADOS – FARMÁCIA – 2008). Sabendo que os meios de cultura consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural, julgue os itens a seguir.

Os meios de cultura empregados em preparações bacteriológicas são sólidos, visto que os meios líquidos não servem para o cultivo de bactérias.

Comentário: Os meios líquidos servem para o cultivo de bactérias. **Resposta: Errado.**

(CESPE – HEMOBRÁS – ESPECIALISTA EM PRODUÇÃO DE HEMODERIVADOS – FARMÁCIA - 2008).
Sabendo que os meios de cultura consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural, julgue os itens a seguir.

O ágar MacConkey é um meio de cultura destinado ao crescimento de bactérias gram-negativas e é empregado na diferenciação de enterobactérias.

Comentário: meio seletivo para bactérias Gram-negativas e diferencial para bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose. **Resposta: Certo.**

(CESPE- HEMOBRÁS – 2008). O ágar MacConkey é um meio de cultura destinado ao crescimento de bactérias gram-negativas e é empregado na diferenciação de enterobactérias.

Comentário: O ágar MacConkey é um meio seletivo e é bastante utilizado na diferenciação de enterobactérias. **Resposta: Certo.**

(CESPE – HEMOBRÁS – 2008). Os meios de cultura empregados em preparações bacteriológicas são sólidos, visto que os meios líquidos não servem para o cultivo de bactérias.

Comentário: Meios líquidos podem ter a função de cultivo, como por exemplo o meio caldo tioglicolato que é altamente nutritivo capaz de proporcionar o cultivo de bactérias aeróbicas, anaeróbicas e microaerófilas. **Resposta: Errado.**

(AOCP - EBSERH/HE-UFSCAR). A imagem a seguir ilustra uma alça de semeadura comumente utilizada em laboratórios de microbiologia. Para utilizarmos este equipamento, devemos esterilizá-lo de forma rápida pelo procedimento denominado:

A) autoclavagem.
B) fervura.
C) lavagem.
D) dessecação.
E) flambagem.

Comentário: A cada utilização da alça bacteriologia devemos realizar a flambagem para esterilização, ou utilizar alça descartável. **Resposta: Letra E.**

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.