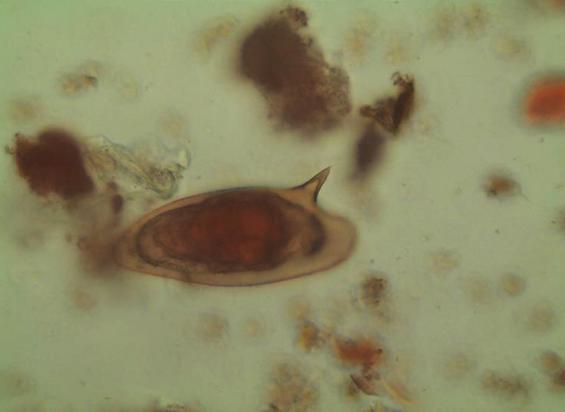
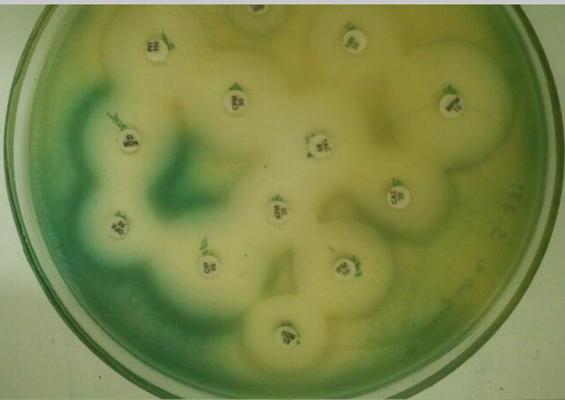


CECÍLIA MARIA DE CARVALHO XAVIER HOLANDA
DAYSE SANTOS ARIMATEIA
RENATO MOTTA NETO

MANUAL DE BACTERIOLOGIA E DE ENTEROPARASITOS





REITORA

Ângela Maria Paiva Cruz

VICE-REITOR

José Daniel Diniz Melo

DIRETORIA ADMINISTRATIVA DA EDUFERN

Luis Passeggi (Diretor)
Wilson Fernandes (Diretor Adjunto)
Judithe Albuquerque (Secretária)

CONSELHO EDITORIAL

Luis Passeggi (Presidente)
Ana Karla Pessoa Peixoto Bezerra
Anna Emanuella Nelson dos S. C. da Rocha
Anne Cristine da Silva Dantas
Christianne Medeiros Cavalcante
Edna Maria Rangel de Sá
Eliane Marinho Soriano
Fábio Resende de Araújo
Francisco Dutra de Macedo Filho
Francisco Wildson Confessor
George Dantas de Azevedo
Maria Aniolly Queiroz Maia
Maria da Conceição F. B. S. Passeggi
Maurício Roberto Campelo de Macedo
Nedja Suely Fernandes
Paulo Ricardo Porfírio do Nascimento
Paulo Roberto Medeiros de Azevedo
Regina Simon da Silva
Richardson Naves Leão
Rosires Magali Bezerra de Barros
Tânia Maria de Araújo Lima
Tarcísio Gomes Filho
Teodora de Araújo Alves

EDITORIAÇÃO

Kamyla Alvares (Editora)
Alva Medeiros da Costa (Supervisora Editorial)
Natália Melão (Colaboradora)
Emily Lima (Colaboradora)

REVISÃO E NORMALIZAÇÃO

Emanuelle Pereira de Lima Diniz (Revisora de Língua Portuguesa)
Edineide da Silva Marques (Revisora ABNT)

DESIGN EDITORIAL

Michele Holanda (Coordenadora)
Ian Medeiros (Capa)
Ian Medeiros (Miolo)

Cecília Maria de Carvalho Xavier Holanda
Dayse Santos Arimateia
Renato Motta Neto

Manual de Bacteriologia e de Enteroparasitos



Natal, 2017

Coordenadoria de Processos Técnicos
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN /
Biblioteca Central Zila Mamede

Holanda, Cecília Maria de Carvalho Xavier.

Manual de bacteriologia e de enteroparasitos / Cecília Maria de Carvalho Xavier Holanda,
Dayse Santos Arimateia, Renato Motta Neto. – Natal, RN : EDUFRN, 2017.
134 p. : PDF ; 3,2 Mb.

Modo de acesso: <http://repositorio.ufrn.br>

ISBN 978-85-425-0743-0

1. Bacteriologia. 2. Enteroparasitos. 3. Biossegurança. 4. Parasitologia. 5. Microbiologia.
6. Análises clínicas. I. Arimateia, Dayse Santos. II. Motta Neto, Renato. III. Título.

RN/UF/BCZM

2017/56

CDD 616.075
CDU 616-093/-098

Todos os direitos desta edição reservados à EDUFRN – Editora da UFRN
Av. Senador Salgado Filho, 3000 | Campus Universitário
Lagoa Nova | 59.078-970 | Natal/RN | Brasil
e-mail: contato@editora.ufrn.br | www.editora.ufrn.br
Telefone: 84 3342 2221

Prefácio

A realização de atividades práticas em laboratório é de fundamental importância para a formação do aluno nas áreas de Microbiologia e Parasitologia, uma vez que o aprendizado nessas áreas de conhecimento requer o desenvolvimento e aprimoramento de habilidades adquiridas somente por meio da manipulação de espécimes clínicos, o que envolve a realização de procedimentos e manobras específicas. Assim, a aprendizagem nessas áreas exige a participação ativa do aluno na construção do conhecimento técnico e no desenvolvimento de habilidades e competências que dependem da vivência prática. O sucesso do aluno na realização dessa tarefa depende, não apenas, de uma boa orientação do professor, mas também de uma fonte de referência que lhe sirva de suporte para o entendimento dos fundamentos dos métodos utilizados, apresentados em linguagem clara e acessível, em que ele possa acompanhar passo a passo, o procedimento que deseja executar. Este livro, intitulado *Manual de Bacteriologia e de Enteroparasitos*, elaborado pelos professores Cecília Maria de Carvalho Xavier Holanda, Renato Motta Neto e pela Biomédica Dayse Santos Arimateia se constitui como excelente recurso didático, especialmente para o aluno de Microbiologia e Parasitologia Clínicas, servindo de guia para a execução de procedimentos destinados ao diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas e parasitárias.

O livro aborda normas de Biossegurança, equipamentos, utilizados como barreiras de segurança, no ambiente de laboratório, além de enfatizar a importância da adoção de boas práticas aplicadas em laboratório de análises clínicas. Ensina o

uso adequado dos equipamentos de proteção individual e coletivo, visando à proteção tanto de quem executa o procedimento quanto das pessoas que trabalham no local, o destino adequado dos resíduos perfurocortantes e do material contaminado, visando à prevenção de acidentes de trabalho e à proteção do meio ambiente. Ainda oferece subsídios sobre um conjunto de medidas e atividades planejadas e sistemáticas, visando à garantia e o controle de qualidade dos exames realizados.

Na área da Bacteriologia são abordados os aspectos relativos aos procedimentos de coleta, isolamento e identificação de principais espécies bacterianas isoladas na rotina, preparo de lâminas, métodos de coloração, confecção de meios de cultura, soluções e reagentes utilizados na rotina de um laboratório de bacteriologia. Apresenta os vários tipos de meios de cultivo, enfatizando a sua aplicação para o isolamento e identificação dos diferentes grupos de bactérias mais comuns em nosso meio, descrevendo os aspectos mais importantes no que se referem ao crescimento bacteriano, características das colônias, produção de pigmento, e outras características apresentadas por diferentes bactérias em cada um desses meios de cultura. Aborda sobre o isolamento e identificação de bactérias a partir de diferentes materiais biológicos e descreve de forma detalhada sobre as provas de identificação mais utilizadas em Bacteriologia, desenvolvidas com base no conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no metabolismo bacteriano, incluindo: hidrólise, oxidação, fermentação de compostos, produção de pigmento, além de sensibilidade ou resistência a agentes antimicrobianos.

Na área da enteroparasitos, o livro aborda sobre o exame parasitológico de fezes para detecção de protozoários e helmintos intestinais, abrangendo desde a coleta, preservação e processamento do material, exame macroscópico das fezes, exame microscópico das fezes por diferentes métodos e técnicas. Ensina a utilização de técnicas com diferentes graus de sensibilidade e especificidade, coloração de esfregaços fecais

para a visualização de formas parasitárias, tais como: ovos, larvas, cistos e oocistos, em que são descritas as características específicas dessas estruturas para cada tipo de parasito e apresentadas figuras ilustrativas desses componentes para os patógenos, mais comuns em nosso meio, permitindo a sua identificação.

Dessa forma, este Manual de Bacteriologia e de Enteroparasitos representa um auxílio extraordinário não apenas para o aluno no acompanhamento das aulas práticas de Microbiologia e Parasitologia, mas também para os profissionais que atuam na área de Análises Clínicas, como fonte permanente de consulta durante a sua rotina de trabalho.

Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes

Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN

Sumário

Capítulo 1 - Biossegurança	11
Nível de Biossegurança	12
Nível de Biossegurança 2 - NB-2	12
Práticas e padrões a serem adotados	13
Barreiras primárias	20
Barreiras secundárias	21
Procedimentos em caso de acidentes	25
Procedimentos em caso de acidentes com exposição a material biológico	27
Capítulo 2 - Bacteriologia	29
Colorações mais frequentes na rotina de Bacteriologia Clínica	30
Bacterioscopia e Bacilosopia	30
Coloração de Gram	30
Coloração de Ziehl-Neelsen	37
Identificação etiológica de espécies mais frequentes na rotina do laboratório clínico	41
Enterobactérias	41
Cocos Gram-positivos	63
Bacilos Gram-negativos não fermentadores	70
Entendendo a fase analítica de espécimes clínicos frequentes na rotina bacteriológica	76
Urocultura	76

Hemocultura	78
Cultura de ponta de cateter	82
Líquor	83
Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	85
O método de Kirby-Bauer	85
Resistência bacteriana a antimicrobianos	89
Confirmação fenotípica de alguns mecanismos de resistência bacteriana	90
Betalactamases de espectro estendido (ESBL)	90
Produção de AmpC	91
Grupo Carbapenemases	92
Grupo KPC	93
Grupo MBL	94
<i>Staphylococcus</i> sp.	95
Referências	97
Capítulo 3 - Enteroparasitos	99
O exame parasitológico de fezes	100
Coleta e preservação do material fecal	102
Exame macroscópico das fezes	103
Exame microscópico das fezes	104
Técnicas e métodos utilizados rotineiramente no exame de fezes	105
Formas evolutivas dos principais enteroparasitos no exame de fezes	109
Ovo de Ancilostomídeo	109
Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>	110
Ovo de <i>Hymenolepis nana</i>	111
Ovo de <i>Hymenolepis diminuta</i>	112
Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> fértil não embrionado	113
Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> fértil embrionado (Figura 3.6)	114
Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> infértil	115

Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> fértil decorticado (Figura 3.8)	116
Ovo de <i>Taenia</i> sp.	117
Ovo de <i>Enterobius vermicularis</i>	118
Ovo de <i>Trichuris trichiura</i>	119
Ovo de <i>Diphyllobothrium latum</i> (tênia do peixe)	120
Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i>	121
Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i> – esôfago do tipo “rabditoide”	122
Larva de <i>Strongyloides stercoralis</i> – primórdio genital	123
Cisto de <i>Endolimax nana</i>	124
Cisto de <i>Iodamoeba bütschlii</i>	125
Cisto de <i>Giardia lamblia</i>	126
Oocistos de <i>Cystoisospora belli</i>	127
Cisto de <i>Entamoeba coli</i>	128
Cisto de <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	129
Cisto de <i>Chilomastix mesnili</i>	130
Os autores	132

Capítulo 1

Biossegurança

-

Me. Dayse Santos Arimateia

Nível de Biossegurança

Todo profissional que atua em laboratório clínico deve realizar suas atividades de modo a evitar sua contaminação e a do meio ambiente. A Biossegurança corresponde ao conjunto de práticas, equipamentos e instalações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de prestação de serviços, pesquisas, produção e ensino, visando à saúde dos homens, à preservação do ambiente e à qualidade dos resultados.

Existem quatro níveis de Biossegurança: NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4, crescentes no maior grau de contenção e complexidade do nível de proteção, que consistem de combinações de práticas e técnicas de laboratório e barreiras primárias e secundárias de um laboratório. O Nível de Biossegurança 2 é adequado para qualquer trabalho que envolva sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou linhas de células humanas primárias em que a presença de um agente infeccioso pode ser desconhecida. Nesse manual, daremos ênfase ao Nível de Biossegurança 2, o qual corresponde ao nível de Biossegurança dos laboratórios de análises clínicas.

Nível de Biossegurança 2 - NB-2

O Nível de Biossegurança 2 é adequado ao trabalho que envolva agentes de risco moderado para as pessoas e o meio ambiente. Difere do NB-1 nos seguintes aspectos: o pessoal de laboratório deverá ter um treinamento específico no manejo de agentes patogênicos e devem ser supervisionados por profissionais competentes; o acesso ao laboratório deve ser limitado

durante os procedimentos operacionais; precauções extremas serão tomadas em relação a objetos cortantes infectados.

As práticas, os equipamentos, o projeto e a construção do laboratório NB-2 são aplicáveis aos laboratórios clínicos, de diagnóstico, laboratórios escolas e outros laboratórios onde o trabalho é realizado com um maior espectro de agentes nativos de risco moderado presentes na comunidade e que estejam associados a uma patologia humana de gravidade variável. Com boas técnicas de microbiologia, esses agentes podem ser usados de maneira segura em atividades conduzidas sobre uma bancada aberta, uma vez que o potencial para a produção de borrfios e aerossóis é baixo. O vírus da hepatite B, o HIV, a salmonela e o *Toxoplasma spp.* são exemplos de microrganismos designados para este nível de contenção.

Embora os organismos rotineiramente manipulados em um Nível de Biossegurança 2 não sejam transmitidos através de aerossóis, os procedimentos envolvendo um alto potencial para a produção de salpicos ou aerossóis, que possam aumentar o risco de exposição de funcionários e/ou estudantes, devem ser conduzidos com equipamentos de contenção primária ou com dispositivos como a Cabine de Segurança Biológica (CSB) ou os copos de segurança da centrífuga. Outras barreiras primárias, como os escudos para borrfios, proteção facial, aventais e luvas devem ser utilizados.

As barreiras secundárias como pias para higienização das mãos e instalações para descontaminação de lixo devem existir com o objetivo de reduzir a contaminação potencial do meio ambiente.

Práticas e padrões a serem adotados

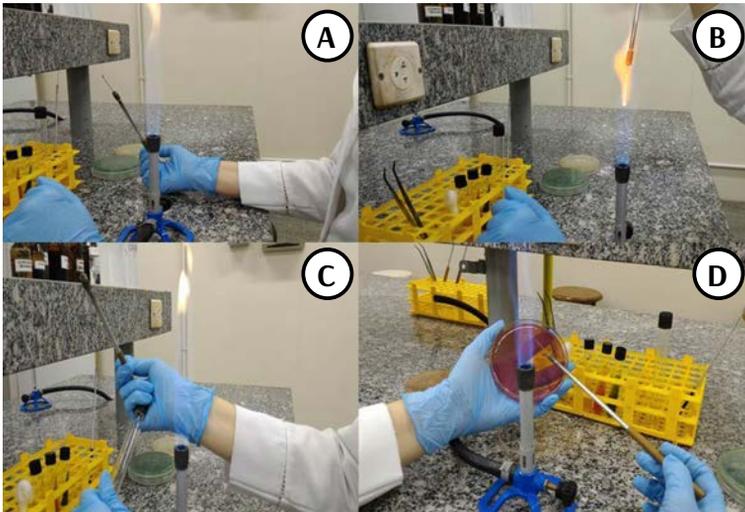
Os seguintes padrões e práticas especiais, os equipamentos de segurança e as instalações são aplicáveis aos agentes designados para o Nível de Biossegurança 2.

Práticas Padrão

1. O acesso ao laboratório deverá ser limitado, quando as atividades estiverem sendo realizadas.
2. Os usuários do laboratório devem lavar as mãos após a manipulação de materiais viáveis, após a remoção das luvas e antes de saírem do laboratório.
3. É proibido comer, beber, fumar, manusear lentes de contato e aplicar cosméticos nas áreas de trabalho. Os alimentos deverão ser guardados fora das áreas de trabalho.
4. É proibida a pipetagem com a boca; devem ser utilizados dispositivos mecânicos (peras ou pipetador tipo lápis).
5. Devem ser instituídas normas para o manuseio de agulhas. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as agulhas descartáveis devem ser desprezadas juntamente com as seringas, sendo proibido reencapá-las ou proceder a sua retirada manualmente.
6. Todos os procedimentos devem ser realizados cuidadosamente a fim de minimizar a criação de borrifos ou aerossóis. Por exemplo, ao abrir um microtubo (tipo *ependorf*), tubo com sangue ou soro, fazer de forma lenta, de preferência voltando o movimento de abertura para longe de seu rosto.
7. As superfícies de trabalho devem ser descontaminadas com álcool etílico 70%, ao final do trabalho ou no final do dia e após qualquer vazamento ou borrifada de material viável. Em se tratando do setor de microbiologia, recomenda-se a limpeza da bancada antes e depois da realização do trabalho.

- Na rotina de bacteriologia é de fundamental importância o conhecimento das corretas manobras assépticas, durante as quais o manuseio do material acontece primordialmente com um bico de Bunsen ligado separando o operador e o material analisado (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Manobras assépticas. A – Observe o posicionamento do operador. Todas as atividades devem ser realizadas na parte posterior à chama. B – Flambagem da alça bacteriológica. C – Abertura de tubos com tampa rosqueável ou de algodão deve ser feita apoiando-se a tampa do tubo no dedo mínimo e a palma da mão. A tampa permanece na mão do operador durante o semeio. D – Semeio em meio sólido em placa.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia. DMP-CB.

- Todas as culturas, colônias e outros resíduos deverão ser descontaminados, por esterilização em autoclave, antes de serem descartados.
- Sempre ao entrar em um laboratório, fique atento à sinalização e avisos (Figura 1.2). Realize suas atividades com paciência e tranquilidade.

Figura 1.2 – Símbolo indicativo do risco biológico. Para descartar material contaminado (luvas, gaze, algodão etc.), procure lixeiras com sacos brancos que apresentam esse símbolo.



Fonte: NR 32 – Risco Biológico. Disponível em: <<https://saudefacil.wordpress.com/2013/04/25/nr-32-risco-biologico/>>. Acesso em: 26 abr. 2016.

Práticas Especiais

- 1.** O acesso ao laboratório deverá ser limitado ou restrito, quando o trabalho com agentes infecciosos estiver sendo realizado (manipulação de sangue, soro, urina, fezes e demais espécimes clínicos). Em geral, pessoas susceptíveis às infecções ou pessoas que, quando infectadas, possam apresentar sérias complicações não serão permitidas no laboratório. Por exemplo, pessoas que estejam imunocomprometidas poderão estar correndo um sério risco de contaminação.
- 2.** O pessoal do laboratório bem como estudantes devem estar apropriadamente imunizados quanto aos agentes manipulados ou potencialmente presentes no laboratório

(por exemplo, vacina contra a hepatite B, tétano, de campanha – H1N1 –, por exemplo).

3. Recomenda-se a manutenção, para referência futura após casos de acidentes, de amostras sorológicas da equipe do laboratório e de outros trabalhadores que possam estar expostos aos riscos, equipe de higienização, por exemplo. Amostras sorológicas adicionais devem ser colhidas periodicamente.
4. Toda a equipe deve ter acesso ao manual de Biossegurança do laboratório para ciência dos riscos inerentes às atividades desenvolvidas em laboratórios clínicos. Devem ler e seguir as instruções sobre as práticas e os procedimentos.
5. A equipe de funcionários do laboratório deverá participar de cursos de atualização periodicamente ou treinamento adicional, quando necessário, e também no caso de mudanças de normas ou procedimentos.
6. Os resíduos do grupo E, segundo a RDC 306 da ANVISA, devem sempre ser tratados com especial precaução. Esses resíduos são os materiais perfurocortantes, incluindo seringas e agulhas, lâminas, pipetas, tubos capilares, lancetas etc.
 - a) Agulhas e seringas hipodérmicas ou outros instrumentos cortantes devem ficar restritos ao laboratório.
 - b) As agulhas descartáveis usadas não deverão ser dobradas, quebradas, reutilizadas, removidas das seringas ou manipuladas antes de desprezadas. Elas deverão ser cuidadosamente colocadas em recipiente resistente a perfurações, localizado convenientemente e utilizado para recolhimento de objetos cortantes desprezados. Objetos cortantes não descartáveis devem ser colocados em um

recipiente cuja parede seja resistente para o transporte até a área para descontaminação.

c) Ao utilizar o sistema a vácuo, deve-se tomar cuidado adicional ao remover o adaptador da agulha.

d) Vidros quebrados não devem ser manipulados diretamente com a mão, devem ser removidos por outros meios, tais como vassoura e pá de lixo ou pinça e levados ao recipiente específico para seu descarte. Os recipientes contendo vidros quebrados contaminados (por exemplo, provenientes da microbiologia) deverão passar por um processo de descontaminação antes de serem desprezados.

7. Amostras de fluidos corpóreos ou dejetos potencialmente infecciosos devem ser colocados em um recipiente com uma tampa que evite o vazamento durante a coleta, o manuseio, o processamento, o armazenamento e/ou transporte.
8. Os equipamentos laboratoriais (centrífugas, microcentrífugas, banho-maria, microscópio etc.) e as superfícies de trabalho deverão ser descontaminados rotineiramente com álcool 70% ou hipoclorito de sódio 1% (vide Tabela 1.1 para utilização da água sanitária comercial), após a conclusão do trabalho com materiais infecciosos e, especialmente, após borrifos e derramamentos. Vale salientar que é muito importante verificar o manual do equipamento quanto à sua limpeza.

Tabela 1.1 – Diluição para utilização da água sanitária comercial (solução aquosa de hipoclorito de sódio).

Volume de água sanitária	Volume de água (ml)	Diluição**	Porcentagem de cloro livre	Tempo de exposição (minutos)	Utilização
Pura*	0	-	2% (20.000ppm)	-	Altamente corrosivo para metais – em frasco afunilado para desprezar material líquido contaminado.
1ml	1	1/2	1% (10.000ppm)	10 a 20	Alto poder de descontaminação – superfícies porosas ou sobre material biológico derramado.
1ml	19	1/20	0,1 (1.000ppm)	10	Médio poder de descontaminação – superfícies (bancadas de trabalho) sem material biológico derramado.

* Todas as diluições devem ser feitas semanalmente com água de torneira e guardadas em frasco âmbar ou fosco para prevenir a perda da ação descontaminante durante a estocagem.

** Geralmente as águas sanitárias nacionais apresentam 2% de cloro livre (sempre verificar o rótulo).

Fonte: Adaptada de Oplustil *et al.* (2004).

9. Recomenda-se que as bancadas sejam forradas com papel *Kraft* antes da realização de procedimentos envolvendo material potencialmente infectante ou corrosivo. Ao final do trabalho, o papel *Kraft* deverá ser removido e descartado em recipiente com saco branco (para resíduo infectante).
10. Todo equipamento deverá ser descontaminado antes de ser enviado para conserto, manutenção ou acondicionado para transporte.
11. Respingos e acidentes resultantes de exposição a materiais infecciosos deverão ser imediatamente notificados. A avaliação médica, a vigilância e o tratamento deverão ser providenciados. Registros do acidente e das providências adotadas deverão ser mantidos por escrito no livro de notificação de acidentes do laboratório.

Barreiras primárias

1. A proteção para o rosto (máscaras de proteção, protetor facial, óculos de proteção ou outra proteção para respingos) deve ser usada para prevenir respingos ou *sprays* provenientes de materiais infecciosos ou de outros materiais perigosos.
2. No interior do laboratório, os profissionais deverão utilizar roupas apropriadas, como jalecos, gorros, sapatos fechados e calça comprida. Antes de sair do laboratório para as áreas externas (copa, escritório, pátio etc.), o jaleco, luvas e máscara devem ser retirados e as mãos lavadas.
3. Sempre use luvas! Evite o contato direto com materiais e superfícies potencialmente infecciosos ou equipamentos contaminados. Essas luvas devem ser desprezadas, quando estiverem contaminadas, quando o trabalho com materiais

infecciosos for concluído ou quando sua integridade estiver comprometida. Luvas descartáveis não poderão ser lavadas, reutilizadas ou usadas para tocar superfícies “limpas” (celulares, telefones e teclado da área administrativa etc.) e não devem ser usadas fora do laboratório. As mãos deverão ser lavadas após a remoção das luvas.

Barreiras secundárias

1. É importante um sistema de portas com trancas em dependências que abriguem agentes restritos.
2. Para a lavagem das mãos, recomendamos a utilização de pias cujas torneiras funcionem automaticamente. Caso isso não seja possível, evite ligar o registro de abertura da torneira com as mãos, utilize o cotovelo. Cada laboratório deve ter uma pia exclusiva para a lavagem das mãos.
3. O laboratório deverá ser organizado sempre de modo a permitir fácil limpeza e descontaminação. Carpetes, tapetes, vasos de plantas, ventiladores não são apropriados para laboratório.
4. Os móveis do laboratório devem suportar cargas e usos previstos com espaçamento suficiente entre bancadas, cabines e equipamentos para permitir acesso fácil para limpeza. As cadeiras e outros móveis utilizados no trabalho laboratorial devem ser cobertos, preferencialmente com um material que não seja permeável e que possa ser facilmente descontaminado.
5. No caso de utilização de Cabines de Segurança Biológica (CSB), é importante atentar que as mais adequadas para laboratórios clínicos são as CSBs Classes II A2 ou B2. A instalação da cabine deve ser feita de modo que a variação da entrada e da saída de ar da sala não provoque alteração

nos seus padrões de funcionamento. As cabines devem estar localizadas longe de portas e janelas que possam ser abertas, áreas laboratoriais muito cheias e que possuam outros equipamentos potencialmente dilaceradores de ar, de forma que sejam mantidos os parâmetros de fluxo de ar da cabine. Lembre-se de que a CSB não é capela de exaustão. As capelas de exaustão devem ser usadas para manipulação de reagentes químicos que produzem vapores. A manipulação de tais tipos de reagentes em uma CSB pode afetar e/ou diminuir a vida útil do seu sistema de filtração.

Utilizando uma CSB

1. Planeje o trabalho com antecedência. Reúna todos os materiais necessários antes de colocá-los dentro da cabine. Esses pequenos cuidados no início evitam que o trabalho seja interrompido durante sua execução.
2. Ligue a cabine pelo menos 5 minutos antes do início das atividades para estabilizar o fluxo de ar.
3. Lave as mãos.
4. Coloque os equipamentos de proteção individual: jaleco (preferencialmente de mangas justas ou presas por baixo da luva), luvas, máscara e óculos de segurança.
5. Faça a descontaminação da superfície interna da cabine, pulverizando as paredes e a superfície de trabalho com álcool etílico 70%. Limpe as superfícies começando pelo fundo, laterais e mesa de trabalho (utilize gaze embebida em álcool etílico 70% e uma pinça longa para locais de difícil acesso). Limpe as paredes de cima para baixo e a mesa de trabalho de trás para a frente, seguindo o fluxo de exaustão e evitando trazer a contaminação removida

na sua direção. Tome cuidado para não atingir o filtro nem as lâmpadas. JAMAIS COLOQUE A CABEÇA DENTRO DA CABINE!

6. Ao limpar as lâmpadas UV e fluorescente, não toque com gaze úmida nos terminais elétricos.
7. Descontamine a CSB diariamente ao ligá-la, e repita os procedimentos de descontaminação quando a cabine ficar desligada por uma hora. Nunca realize nenhum procedimento dentro da CSB antes de descontaminá-la.
8. Troque as luvas.
9. Coloque todos os materiais, previamente desinfetados com álcool etílico 70%, de forma organizada no fundo da cabine, procurando sempre evitar o bloqueio do fluxo de ar.
10. Organize os materiais de modo que os instrumentos fiquem localizados de maneira a facilitar a utilização, evitando o cruzamento dos braços de um lado para o outro dentro da cabine. Os itens limpos e os contaminados devem ficar em lados opostos na cabine.
11. Materiais volumosos (recipientes para resíduos e caçapas para pipetas) devem ser acomodados nas laterais da CSB.
12. Ligue a lâmpada UV por 15 ou 20 minutos depois do processo de desinfecção.
13. Desligue a lâmpada UV. Nunca trabalhe com a luz UV ligada, essa radiação prejudica nossos olhos e pele.
14. Ajuste a altura da sua cadeira, para que seu rosto fique acima da abertura frontal.

15. Posicione os braços dentro da cabine e espere alguns segundos para estabilização do fluxo de ar e a remoção de partículas contaminantes que são introduzidas junto com os braços. Evite movimentos bruscos dentro da cabine, isso pode interferir no fluxo de ar.
16. Execute as atividades sempre no sentido da área limpa para área contaminada.
17. Sempre que notar algum salpico ou borrifo de material contaminado dentro da cabine, procure limpar imediatamente, caso contrário, o líquido pode secar e você não saberá onde aconteceu. A fim de minimizar essa ocorrência, o trabalho dentro da CSB pode ser realizado sobre toalhas de papel absorventes, que capturam borrifos e salpicos.
18. Quando tiver necessidade de utilizar uma mesa auxiliar ao lado da cabine, tome cuidado com o movimento de retirar e inserir os braços. Recomenda-se colocar os recipientes de descarte de resíduos dentro da cabine, uma vez que a frequência de movimentos dos braços para dentro e para fora interfere na integridade da barreira de ar e pode comprometer a proteção do profissional e da amostra manipulada.
19. Realize o trabalho dentro da CSB de forma tranquila e atenta. Trabalhar apressadamente em uma CSB pode induzir a uma maior ocorrência de erros.
20. Bicos de Bunsen não devem ser usados dentro das CSB, uma vez que a chama perturba o fluxo de ar e pode ser perigosa quando se utilizam substâncias químicas voláteis, além do risco de queimar o filtro HEPA (do inglês *High Efficiency Particulate Air*).
21. Sempre que tiver dúvidas, verifique o manual do usuário referente à sua CSB.

Após utilizar a CSB

1. Descontamine a superfície, incluindo o papel absorvente usado na área de trabalho, caso o tenha utilizado, pulverizando álcool a 70%.
2. Desloque os objetos já descontaminados para a área descontaminada dentro da cabine e, em seguida, retire-os, na seguinte ordem: material que vai para a estufa, material destinado ao saco para resíduo infectante (branco), material que deverá ser autoclavado.
3. As luvas utilizadas no trabalho com a CSB devem ser descartadas como resíduo infectante.
4. Ligue a lâmpada UV por 15 a 20 minutos depois do processo de desinfecção.
5. Ao terminar o trabalho, deixe a cabine ligada por 5 a 10 minutos para que o ar contaminado seja filtrado.
6. Para que a Cabine de Segurança Biológica funcione perfeitamente, é importante que sua manutenção seja observada a contento. Para instruções sobre os procedimentos adequados de limpeza da CSB, vide o manual de procedimentos operacionais padrão ou manual do equipamento.

Procedimentos em caso de acidentes

O ideal é que os laboratórios possuam instalado um dispositivo do tipo chuveiro de emergência com lava-olhos acoplado. Esse dispositivo deverá ser usado para banhos em caso de acidentes com produtos químicos ou material biológico sobre o profissional. No caso de respingos acidentais de materiais biológicos ou químicos na mucosa ocular, o lava-olhos

deverá ser utilizado. Esse tipo de dispositivo deve ser testado semanalmente para verificar seu bom funcionamento.

Derramamento de material potencialmente infeccioso

1. Cubra o material com papel toalha ou gaze.
2. Despeje sobre o papel ou gaze solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo. Realize essa operação cuidadosamente para evitar respingos e a formação de aerossóis. Garanta que todo o material entre em contato com o hipoclorito.
3. Deixe agir por 20 minutos.
4. Se houver material quebrado, recolha-o com auxílio de pinça.
5. Recolha o restante com papel toalha.
6. Coloque dentro de sacos plásticos autoclaváveis ou na falta deles, dois sacos para lixo infectante podem ser usados. Quando houver cacos de vidro, coloque o saco com o material recolhido, de preferência, dentro de um recipiente rígido para evitar acidentes.
7. Depois faça o descarte final como resíduo infectante.
8. Aplique novamente a solução desinfetante na área ou superfície onde houve o derramamento.
9. Deixe o desinfetante agir por 10 minutos.
10. Finalize a limpeza da área afetada com papel toalha embebido em solução desinfetante.

Procedimentos em caso de acidentes com exposição a material biológico

Exposição percutânea

1. Lave a região afetada exaustivamente com água e sabão. É recomendável que seja utilizada uma solução antisséptica, como a clorexidina degermante. As soluções irritantes, tais como éter ou hipoclorito, são contraindicadas, pois podem aumentar a área exposta.
2. Não utilize escovinhas para não promover escarificação na pele; não comprima a área do ferimento, para não favorecer a vascularização da área.

Exposição de mucosas

1. Lave exaustivamente com água ou solução fisiológica a 0,9%. O ideal é que o laboratório possua um frasco lava-olhos para os casos de contaminação ocular.
2. Após os cuidados iniciais, o acidentado deve ser levado a um hospital (especializado em doenças infecciosas, de preferência). Nos acidentes com material biológico é extremamente importante, se possível, identificar a amostra envolvida e levá-la junto com o acidentado até o serviço de saúde. A amostra envolvida no acidente, assim como uma amostra do acidentado serão testadas para presença de HIV e Hepatites. Em seguida, o clínico responsável realizará o protocolo de prevenção.
3. Recomenda-se que o laboratório tenha um kit para teste rápido de HIV disponível, pois um teste preliminar pode ser realizado *in loco* e tranquilizar o envolvido no acidente. Vale frisar que essa medida não substitui a necessidade

de levar a amostra até o serviço de saúde especializado. Lembre-se de procurar o LIVRO PARA REGISTRO DE ACIDENTES do laboratório e notificar o ocorrido.

Referências

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 306, de 7 de dezembro de 2004. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, 10 dez. 2004. Seção 1.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 302, de 13 de outubro de 2005. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, 14 out. 2005. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia*. 3. ed. rev. e atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais Biossegurança. *Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais*. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010 (Série TELELAB).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.204, de 20 de outubro de 2010. Norma Técnica de Biossegurança para Laboratórios de Saúde Pública. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, 21 out. 2010. Seção 1.
- OPLUSTIL, Carmen Paz *et al.* *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

Capítulo 2

Bacteriologia

—

Me. Dayse Santos Arimateia
Prof. Dr. Renato Motta Neto

Colorações mais frequentes na rotina de Bacteriologia Clínica

Bacterioscopia e Baciloscopia

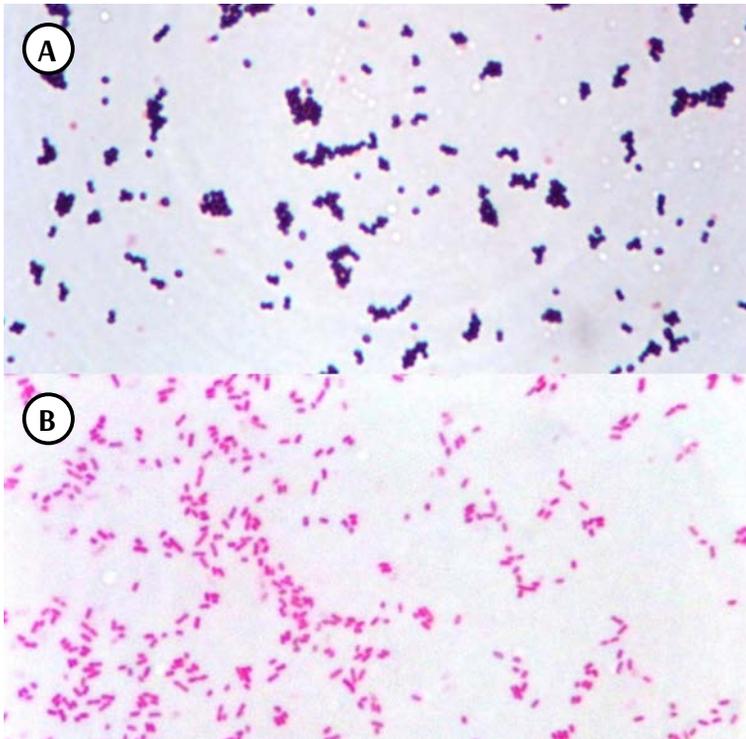
Alguns tipos de amostras, quando chegam ao laboratório de microbiologia, recebem um tratamento direto por meio de colorações, como por exemplo: *swabs*, amostras obtidas após aspiração, fragmentos de tecido e biópsias, líquidos orgânicos em geral e secreções. A importância das colorações é que, ao contrário das demais provas microbiológicas, fornecem um resultado rápido. Na prática clínica existem duas técnicas que são largamente empregadas, a coloração de Gram Kopeloff-Beerman (Coloração de Gram) e a de Ziehl-Neelsen, que serão abordadas em seguida.

Coloração de Gram

A coloração Gram, ou bacterioscopia, permite classificar as bactérias de acordo com suas características morfológicas e tintoriais. Esse teste serve para um diagnóstico presuntivo rápido de um agente infeccioso e para uma avaliação da qualidade da amostra. A coloração de Gram diferencia as bactérias com base nas características de suas paredes celulares. As bactérias Gram-positivas possuem uma parede espessa de peptidoglicano e grandes quantidades de ácido teicoico, os quais

retêm o corante inicial (cristal violeta), não sendo afetado pelo passo de descoloração com álcool absoluto (ou álcool acetona). Dessa forma, as células apresentam ao final da coloração uma cor azul/roxa. As Gram-negativas, por sua vez, possuem uma parede celular constituída de uma camada fina de peptidoglicano, que permite a descoloração do cristal violeta com o álcool absoluto (ou álcool acetona), e posterior coloração com o corante de fundo, a fucsina. Ao final do processo, as bactérias Gram-negativas apresentam cor rosa/vermelha (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Coloração de GRAM. A – cocos Gram-positivos; B – bacilos Gram-negativos. Atente para a diferença de coloração entre as amostras. Aumento 1000x.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Execução

Preparo do esfregaço

A etapa de preparação do esfregaço faz toda a diferença no resultado final obtido na coloração de Gram, portanto, deve ser realizado com muita atenção e zelo.

a) Amostras recebidas em *swab*

Alguns laboratórios colhem as amostras com *swabs* duplos. Utilize um dos *swabs* para fazer o esfregaço e o outro para cultura.

1. Role delicadamente o *swab* sobre a superfície de uma lâmina limpa.
2. Caso somente um *swab* seja coletado, suspendê-lo em pequeno volume de salina estéril, agite vigorosamente, comprima-o contra a parede do tubo e utilize essa suspensão para o preparo do esfregaço e semeadura.
3. Deixe secar (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).

b) Amostras que requerem centrifugação

1. Centrifugue a amostra (2000 a 5000 RPM / 15 min.), remova o sobrenadante e deixe aproximadamente 0,5 ml do sedimento.
2. Homogeneíze e, com auxílio de uma alça bacteriológica estéril, confeccione o esfregaço. Para aumentar a concentração da amostra, pode-se adicionar uma segunda alçada do sedimento na mesma área onde foi depositado inicialmente o material.

3. Em alguns laboratórios utiliza-se uma citocentrífuga (*cytospin*) para a concentração de amostras líquidas e preparo do esfregaço. Nesse tipo de preparação, a amostra fica concentrada em um círculo de pequeno diâmetro no centro da lâmina.
 4. Deixe secar (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).
- c) Amostras de aspirado, exsudatos, escarro e fezes
1. Nas amostras recebidas em frascos ou tubos estéreis, selecione a parte mais purulenta e confeccione o esfregaço em lâmina. Tenha o cuidado de realizar um esfregaço fino. No caso de amostras de escarro, pode-se utilizar um palito estéril para selecionar uma parte purulenta e realizar o esfregaço.
 2. Caso a amostra seja recebida em seringa, transfira-a para um tubo estéril, homogeneíze, faça o esfregaço e realize a semeadura em meios de isolamento. Se a amostra for muito espessa, pode-se realizar uma diluição em salina estéril antes de fazer o esfregaço.
 3. Deixe secar (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).
- d) Tecidos e biópsias
1. Coloque a amostra em uma placa de Petri estéril e fragmente o tecido com auxílio de um bisturi e uma pinça.
 2. Retire um fragmento da amostra e comprima várias vezes em uma área da lâmina (*imprinting*).

3. Deixe (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).

e) Amostras de urina

Lembre-se de que, além da cultura, caso seja solicitado o EAS (elementos anormais e sedimento, exame de urina de rotina), a amostra precisa, primeiro, passar pela bacteriologia antes de seguir para o setor de uroanálises.

Urina de jato médio: homogeneíze o material e deposite 10 µL de urina (pode ser utilizada a alça calibrada para esse procedimento) em uma lâmina limpa, sem espalhar. Deixe secar, caso o material esteja pouco concentrado, coloque mais duas alçadas, seguindo as mesmas orientações. Deixe secar (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).

f) Esfregaços de colônias bacterianas em meio sólido

1. Coloque uma pequena gota de solução fisiológica sobre a lâmina.
2. Com uma alça ou fio bacteriológico, toque a superfície de uma colônia isolada e a dissolva suavemente na gota de salina depositada na lâmina, faça movimentos circulares até o líquido começar a secar.
3. Deixe (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).

g) Esfregaços provenientes de meios de cultura líquidos

Hemocultura: homogeneíze o frasco e aspire uma pequena quantidade de amostra e coloque uma gota sobre a lâmina, espalhe com auxílio da alça bacteriológica. Deixe (próxima à chama do bico de Bunsen) e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).

Cultura em caldo: transfira uma gota com alça bacteriológica para uma lâmina, realize movimentos circulares até que a amostra seque completamente. Para resultados mais satisfatórios ou no caso de caldos pouco turvos, repita o processo na mesma área que foi inicialmente utilizada. Deixe secar ao ar e fixe no calor (passadas rápidas na chama de bico de Bunsen).

Realizando a coloração

Após realizar um esfregaço de acordo com o tipo de amostra recebida, siga estes passos para realizar a coloração de GRAM:

1. Cubra o esfregaço com cristal violeta e deixe agir por 1 minuto.
2. Lave com água corrente para retirar o excesso de corante.
3. Cubra o esfregaço com Lugol e deixe agir por 1 minuto.
4. Lave com água corrente.
5. Realize a descoloração da lâmina com álcool absoluto até que não escorra mais o cristal violeta (cuidado para não descorar demais, normalmente, 15 a 20 segundos são suficientes).
6. Lave com água corrente.
7. Cubra o esfregaço com fucsina e deixe agir por 40 segundos.
8. Lave com água corrente e seque ao ar ou com papel-filtro/toalha. É aconselhável realizar uma limpeza com álcool no verso da lâmina.
9. Examine ao microscópio óptico. Utilize primeiro a objetiva de menor aumento (10x) para fazer uma análise geral do esfregaço. Observando a qualidade da coloração, espessura do esfregaço, o local onde as bactérias estão mais

concentradas, presença de fungos (leveduras, pseudohifas e hifas), celularidade.

10. Em seguida, examine o esfregaço com a objetiva de imersão (aumento de 100x). Relate as características morfológicas e de arranjo (cocos, bacilos, cocobacilos, aos pares, em cadeias, ramificados) e coloração: Gram-positivo (roxo/azul) ou Gram-negativo (vermelho/rosa). É importante também relatar o tropismo de determinadas espécies bacterianas com relação aos elementos celulares visualizados, por exemplo, sabe-se que diplococos Gram-negativos detectados em uma bacterioscopia de secreção uretral sempre apresentam um comportamento intracelular isto é, no interior de polimorfonucleares.

Existem diversos protocolos de coloração de Gram, que se diferenciam por etapas de lavagem ou no tempo de ação dos corantes em alguns segundos. Portanto, o protocolo aqui descrito pode ser um pouco diferente do que você aprendeu em aula ou em outros livros. Artigos mostram que pequenas variações não alteram o resultado final obtido, de modo que fica a cargo do microbiologista escolher o que melhor se adequa a suas necessidades. Geralmente, colorações feitas em colônias velhas tendem a apresentar falhas na interpretação.

Coloração de Ziehl-Neelsen

Também chamada de pesquisa de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente), baciloscopia ou BK. A coloração de Ziehl-Neelsen é utilizada basicamente para micobactérias, cuja parede celular constituída por ácidos micólicos é resistente à descoloração por álcool-ácido, preservando a cor do corante inicial, fucsina concentrada. Por essa razão, os bacilos apresentam uma coloração vermelha ao final do procedimento. Essa coloração é o método mais rápido para detecção de micobactérias em amostras clínicas com suspeita de tuberculose ou hanseníase.

A pesquisa de micobactérias por baciloscopia pode ser realizada em amostras de escarro, lavado brônquico, lavado gástrico, linfa de lóbulo da orelha (hanseníase), urina, líquido, líquido pleural, biópsias e secreções.

A amostra utilizada com maior frequência para realização de esfregaços para baciloscopia é o escarro. O diagnóstico deve ser feito a partir de duas amostras: a primeira coletada no momento da consulta e, a segunda, no dia seguinte logo após acordar. É extremamente importante que o laboratório ou o médico orientem bem o paciente quanto à coleta da amostra, que deve ser feita em frasco de boca larga, descartável, estéril, transparente, com capacidade de 35-50 ml, com tampa de rosca. As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, transportadas sob refrigeração e acondicionadas de forma que não haja risco de derramamento.

Execução

Preparo do esfregaço de escarro

Vale frisar a importância de seguir com rigor as normas de Biossegurança durante a realização de esfregaços para baciloscopia. De preferência, os esfregaços devem ser feitos em cabines de segurança biológica classe A1 ou A2. Na ausência de uma CSB, o local para realização do esfregaço deve ser isolado, com regulação da circulação de pessoas durante o procedimento e com possibilidade de ampla ventilação ao final; lembrando que o bico de Bunsen deverá permanecer ligado durante todo o processo.

1. Quebre um palito de madeira ao meio e, com as pontas onde se encontram as farpas, escolha a área mais purulenta do escarro para coletar a amostra e distender de forma homogênea sobre a lâmina (ocupando cerca de 2/3), cuidado para não deixar espaços vazios.

2. Espere a lâmina secar em temperatura ambiente próximo ao bico de Bunsen.
3. Fixe o esfregaço passando a lâmina seca pela chama de bico de Bunsen 3 a 5 vezes. Lembre-se de que mesmo após a fixação podem existir bacilos viáveis na lâmina.

Realizando a coloração

1. Cubra o esfregaço com fucsina de Ziehl.
2. Aqueça a parte inferior da lâmina (para isso, pode-se utilizar um chumaço de algodão fixado na ponta de uma vareta e embebido em álcool etílico 70%) até observar a emissão de vapores e espere 5 minutos.
3. Lave com água corrente.
4. Cubra o esfregaço com álcool-ácido (álcool absoluto com 3% de HCl) e deixe por 1 minuto.
5. Lave com água corrente.
6. Cubra o esfregaço com azul de metileno (coloração de fundo) e deixe agir por 2 minutos.
7. Lave com água corrente.
8. Deixe secar ao ar livre.
9. Examine a lâmina ao microscópio na objetiva de imersão, seguindo as diretrizes preconizadas pelo Ministério da Saúde para classificação do número de cruces (+, ++, +++ ou ++++) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Interpretação da baciloscopia (contagem semiquantitativa).

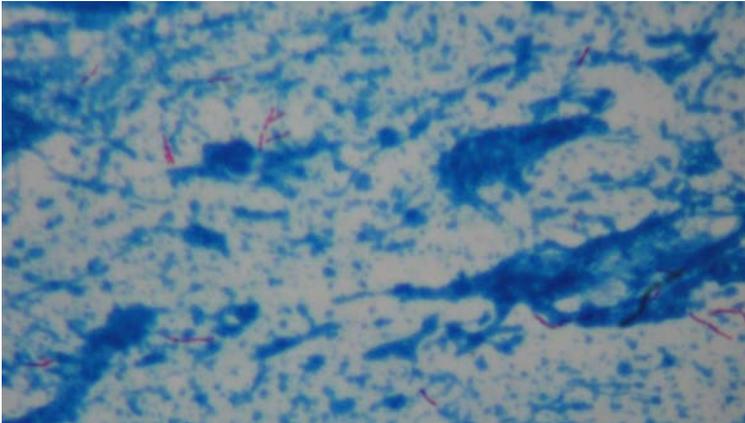
BAAR por campo objetiva (100x)	Resultado
Nenhum BAAR em 100 campos	Negativo
Menos de 1 BAAR por campo em 100 campos	+
De 1 a 10 BAAR em 50 campos	++
Mais de 10 BAAR em 20 campos	+++

Tabela adaptada: “Controle da tuberculose – uma proposta de integração ensino-serviço”.

Fonte: Centro de Referência Professor Hélio Fraga.

Embora ao realizar a coloração de Ziehl-Neelsen estejamos em busca de bacilos, não espere ver bacilos largos e proeminentes como uma *E. coli* observada na coloração de Gram. Os bacilos da tuberculose e hanseníase são bem delgados (Figura 2.2), razão pela qual o microbiologista deve ser bem treinado e atento.

Figura 2.2 - A figura mostra campo de uma lâmina de BK (+++) na qual é possível identificar vários bacilos álcool-ácido resistentes (em vermelho). A coloração de fundo pelo azul de metileno ajuda na identificação dos bacilos.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.
Lâmina proveniente do LACEN-RN.

Identificação etiológica de espécies mais frequentes na rotina do laboratório clínico

Enterobactérias

A família das Enterobacteriaceae compreende um largo número de espécies bacterianas de importância médica. Estas espécies respondem por mais de 70% dos isolados bacterianos na rotina do laboratório clínico, são responsáveis por diferentes agravos infectocontagiosos como gastroenterites, bacteremias, infecções urinárias, infecções de feridas, meningites etc. Estão intimamente associadas a diferentes mecanismos de resistência bacteriana, sobretudo, no ambiente hospitalar. Em termos morfológicos, todas as espécies apresentam um aspecto bacilar e/ou cocobacilar, adquirem coloração rosa/vermelha após coloração de Gram apresentando uma bioquímica de fermentação, são oxidase negativa, anaeróbias facultativas, reduzem nitrato a nitrito, não apresentando a capacidade de formar esporos.

Isolamento

A primeira etapa para a identificação de uma enterobactéria patogênica é o semeio da amostra em um meio de cultura seletivo e diferencial. Os meios mais utilizados para essa

finalidade são: ágar Eosina Azul de Metileno (ágar EMB, também chamado de ágar Teague), ágar McConkey, ágar Salmonella-Shigella (ágar SS), ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e o ágar entérico Hektoen (HE).

Ágar EMB

Nesse meio, os típicos fermentadores da lactose, especialmente a *Escherichia coli*, produzem colônias de coloração escura, apresentando um brilho metálico de tom esverdeado (devido à alta produção de ácidos) (Figura 2.3). Produtores mais fracos de ácido (*Klebsiella*; *Enterobacter*; *Serratia*) formam colônias geralmente acinzentadas. Os não fermentadores de lactose (*Shigella* e *Salmonella*, por exemplo) produzem colônias transparentes.

Figura 2.3 – Placa de ágar EMB semeada com *Escherichia coli*.
Atentar para o brilho metálico característico.

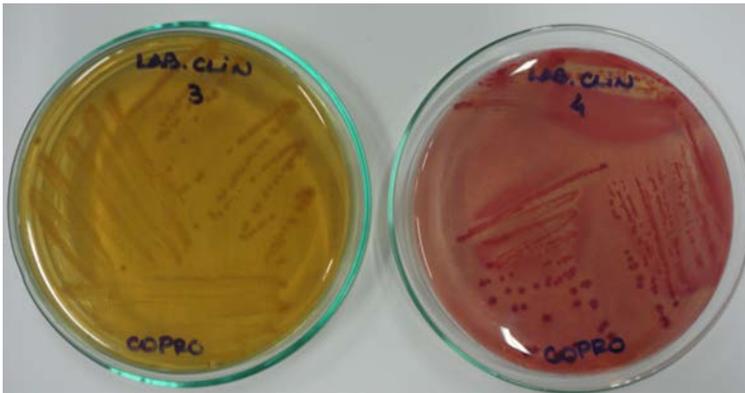


Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar McConkey (MC)

A presença de cristal violeta na constituição desse meio impede o crescimento de bactérias Gram-positivas, especialmente estafilococos e enterococos. Os típicos fermentadores de lactose formam colônias cor de rosa/vermelha, as amostras lactose negativas apresentam-se incolores ou transparentes (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Placas de MC semeadas com amostras lactose negativa (esquerda) e positiva (direita). A zona turva observada na placa lactose positiva deve-se à precipitação de sais biliares.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

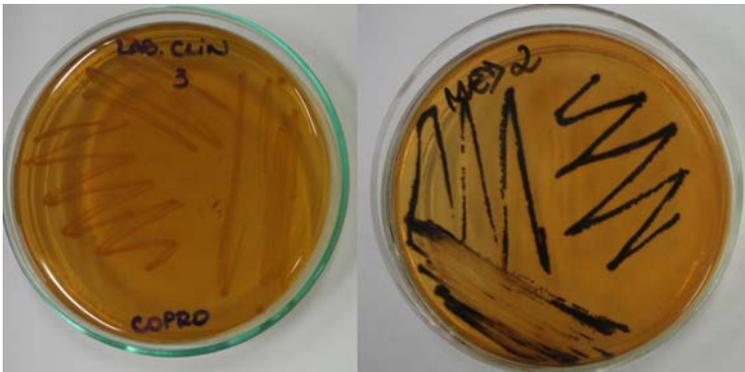
Ágar *Salmonella-Shigella* (SS)

Os meios SS, XLD e HE são empregados no laboratório clínico, geralmente, para o isolamento de espécies de *Salmonella* e *Shigella*, a partir de amostras de fezes diarreicas, ou em laboratórios de saúde pública para investigar uma possível contaminação fecal de alimentos e reservatórios de água.

A incorporação de lactose ao meio SS permite diferenciar entre bactérias fermentadoras de lactose e não fermentadoras. As primeiras formam colônias de aspecto avermelhado, já as que não fermentam lactose geram colônias transparentes.

Uma característica importante desse meio é a presença de tiosulfato de sódio e citrato férrico, o que permite a detecção de H_2S , evidenciado pela formação de pigmentação negra no centro das colônias (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Placas de SS semeadas com bactéria lactose e H_2S negativos (esquerda) e H_2S positivo (direita). Atentar para a pigmentação escura das colônias.

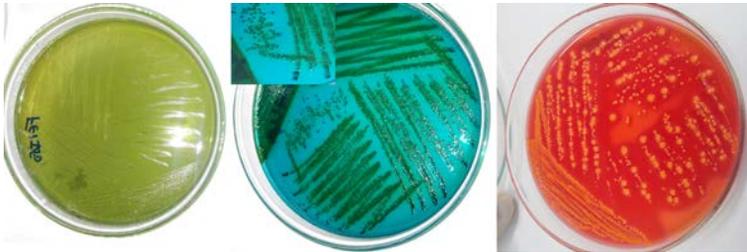


Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar Hektoen (HE)

Meio seletivo e diferencial para isolamento de espécimes enteropatogênicos de *Salmonella* e *Shigella*. Os carboidratos presentes nesse meio incluem a lactose, a sacarose e a salicina. As bactérias fermentadoras desses carboidratos produzem colônias amarelas; as assacarolíticas produzem colônias translúcidas ou verde-claras. As bactérias lactose e sacarose negativas, que acidificam a salicina, podem produzir colônias alaranjadas. O HE contém sais férricos; por conseguinte, as colônias produtoras de sulfeto de hidrogênio apresentam pigmentação negra. Pode-se suspeitar da presença de espécies de *Salmonella* spp. nesses meios, devido à presença de colônias com brilho negro (Figura 2.6).

Figura 2.6 – Meio ágar Hektoen em sua coloração original (placa da esquerda); HE semeado com cepa de *Salmonella* (placa ao centro). Note a presença de pigmento negro. HE semeado com cepa de coliforme fecal (placa à direita).



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar XLD

Esse meio contém lactose, sacarose e xilose; as bactérias que fermentam esses carboidratos formam colônias amarelas. As bactérias que não fermentam esses carboidratos não produzem ácidos e formam colônias incolores. Os microrganismos produtores de H₂S formam pigmento negro, a exemplo do que acontece no ágar SS. As colônias negras sem halo rosado são mais sugestivas de cepas de *Proteus* spp. produtoras de H₂S (Figura 2.7).

Figura 2.7 – Ágar XLD semeado com cepa produtora de H₂S (à esquerda) e não produtora (à direita).



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Provas de identificação

Ágar TSI – Tríplice açúcar ferro

A prova do TSI é uma das mais importantes no processo de identificação de bactérias da família Enterobacteriaceae. O meio tem uma coloração vermelho alaranjada, quando não inoculado, apresenta-se em tubo e no formato inclinado (ou bico de flauta). Veja Figura 2.8.

Esse meio contém três açúcares: 0,1% de glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose, vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de H_2S .

Figura 2.8: TSI – não inoculado.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

A semeadura se faz introduzindo a agulha bacteriológica por picada até o fundo do tubo, seguido por estriamento na superfície inclinada, essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo: a porção inclinada (superfície) e a porção inferior (denominada base). O meio então é incubado a 35-37°C por 18-24 horas. A fermentação é indicada pela mudança de cor do indicador (vermelho de fenol) de vermelho para amarelo e a interpretação segundo o Quadro 2.1 a seguir.

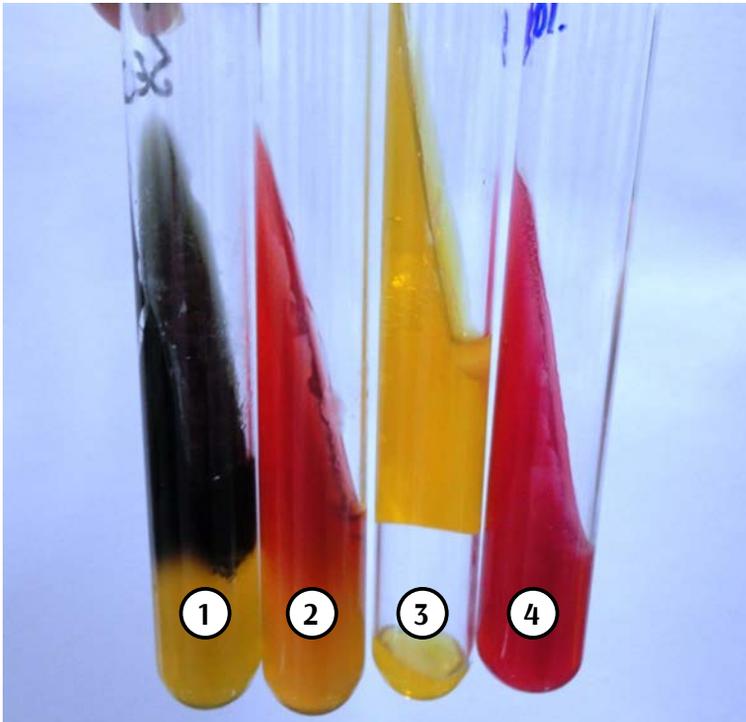
Quadro 2.1 – Interpretação do TSI.

Porção do meio	Ação da bactéria	Característica observada	Exemplo
Base	Produção de gás (CO ₂)	Formação de bolhas ou rachaduras.	<i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i>
	Produção de H ₂ S	Presença de pigmento negro.	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i> e <i>Citrobacter</i>
	Fermentação da glicose	Positivo: coloração amarela. Negativo: inalterada ou púrpura.	Positivo: <i>E. coli</i> ; <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> . Negativo: <i>Pseudomonas</i>
Ápice (superfície)	Fermentação da lactose	Positivo: coloração amarela. Negativo: inalterada ou púrpura.	Positivo: <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> . Negativo: <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> e <i>Pseudomonas</i>

Fonte: Adaptada do Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde da ANVISA (2004).

Considerando-se que todos os membros da família Enterobacteriaceae são fermentadores de glicose, a ausência de alteração (ou leve mudança para púrpura) no meio de TSI caracteriza o indício da presença de bastonetes Gram-negativos não fermentadores (*Pseudomonas*, por exemplo), os quais apresentam um esquema próprio de identificação (Figura 2.9).

Figura 2.9 – Meio TSI inoculado com diferentes bactérias: 1- *Salmonella*; 2- *Shigella*; 3- *Klebsiella* sp. (*E. coli* apresenta comportamento semelhante) e 4- *Pseudomonas* (bastonete não fermentador). Atenção para a produção de H_2S no tubo 1 e intensa produção de gás (CO_2) no tubo 3, tanto *E. coli* como *Klebsiella* sp. podem produzir gás e causar rachaduras no meio, entretanto, normalmente, a *Klebsiella* apresenta uma capacidade maior de gerar quebras.



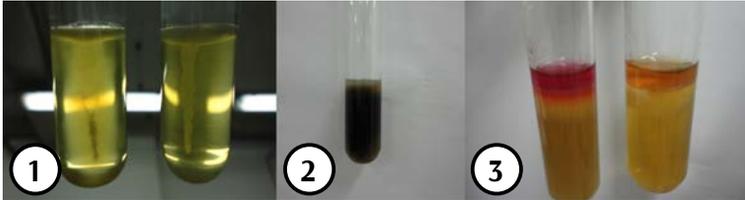
Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar SIM – Sulfeto-Indol-Motilidade

É um meio recomendado na identificação bioquímica de enterobactérias, fornecendo resultados em termos de produção de indol, produção de H_2S e determinação de mobilidade. A formação de indol acontece pela metabolização do aminoácido triptofano (presente no meio) por bactérias produtoras de triptofanase; a desaminação do triptofano gera ácido pirúvico, amônia e indol. Sendo este último detectado pela adição do reativo de Kovacs ao tubo com crescimento. A produção de H_2S é detectada pela presença de tiosulfato de sódio e ferro no meio, o que ocasiona a formação de sulfitos insolúveis, visualizados como um precipitado preto. Os meios para motilidade apresentam porcentagem de até 0,4% de ágar, o que lhes confere uma consistência semissólida, permitindo a dispersão das bactérias que apresentam estruturas de mobilidade; a leitura da mobilidade é feita macroscopicamente colocando-se o tubo contra a luz e observando-se a formação de uma turvação ao redor da linha de inoculação.

A semeadura é feita com a agulha bacteriológica em picada, seguida de incubação a 35-37°C, por 18-24 horas. Deve-se observar a motilidade antes de pingar algumas gotas de reativo de Kovacs (o pigmento enegrecido, se existir, será a primeira característica notada). Se a bactéria for indol positiva, será observado um anel vermelho acima da camada de ágar, após adição do reativo e leve agitação (Figura 2.10). Exemplo de bactérias indol positivo: *Escherichia coli*, *Proteus* sp. Indol negativo: *Salmonella* sp.; *Shigella* sp..

Figura 2.10 – 1- Meio SIM mostrando a zona difusa característica de motilidade em comparação ao crescimento restrito à região de inoculação. 2- Bactéria H_2S positiva formando pigmento negro, na maioria dos casos essa coloração se espalha por toda a camada de ágar. 3- Formação do anel avermelhado característico de amostra indol positiva, após a adição de Reativo de Kovacs.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar Citrato de Simmons

Verifica a capacidade da bactéria de usar o citrato como única fonte de carbono. O meio apresenta-se em tubo e com superfície inclinada, a semeadura é feita com agulha bacteriológica (não furar a base) e deve-se deixar a tampa do tubo frouxa durante o período de incubação. É importante que, ao realizar uma bateria de provas bioquímicas, o citrato seja semeado primeiro, a fim de evitar que proteínas e/ou carboidratos sejam carreados de outros meios para ele. Se a bactéria utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, o nitrogênio também é extraído do fosfato de amônio contido no meio, liberando amônia; nessas condições, ocorre uma alcalinização do meio, alterando sua cor de verde para azul intenso. O indicador de reação é o Azul de Bromotimol (Figura 2.11).

Figura 2.11 – Meio Citrato de Simmons em coloração azul, indicando reação positiva, e em sua cor original (verde).



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

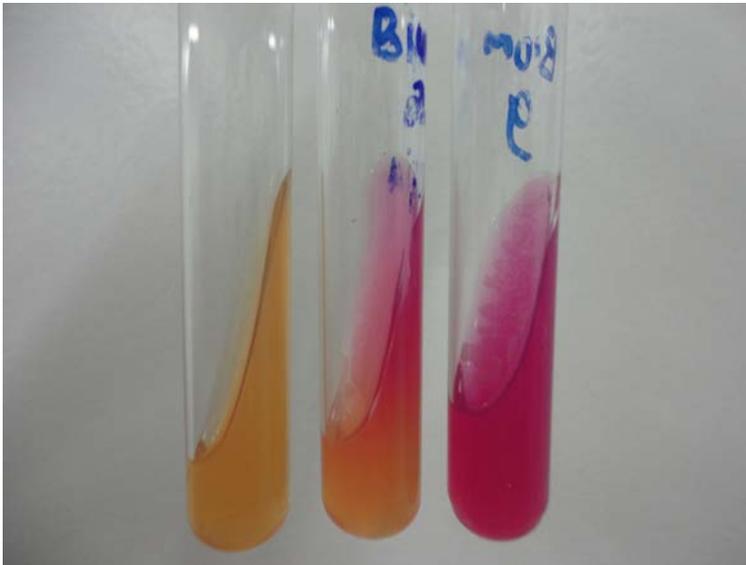
Vale ressaltar que a positividade do teste é dada por aparecimento da cor azul ou crescimento visível na área do inóculo sem mudança de cor. Se, após 24 horas de incubação, houver dúvida na interpretação, incubar por mais 24 ou 48 horas. Exemplos de bactérias citrato positivo: *Salmonella* sp; *Klebsiella* sp.

Ágar Base Ureia (Christensen)

Determina a capacidade da bactéria de degradar ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio. Esse meio possui, inicialmente, uma coloração amarelo/laranja, e as bactérias produtoras de urease provocam uma viragem de cor para rosa/vermelho, que se inicia na superfície e, dependendo da quantidade produzida,

pode se tomar toda a extensão do meio (Figura 2.12). Uma vez que esse meio apresenta uma menor capacidade de tamponamento em relação à Ureia de Stuart (teste realizado em meio líquido), ele permite a detecção de bactérias que produzem menos urease, como certas espécies de *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Brucella* sp. e *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 2.12 – Meio Ureia de Christensen não inoculado (primeiro tubo à esquerda). O segundo tubo mostra reação positiva produzida por microrganismos que são fracos produtores de urease (coloração rosa apenas no ápice), como determinadas espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*. O terceiro tubo mostra forte reação positiva, ocasionando viragem de todo o meio (*Proteus*).



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Teste do VM e VP (Vermelho de Metila e Voges-Proskauer)

Outra forma de identificação de bactérias é a partir de suas diferenças quanto à via de metabolização do piruvato.

Muitas bactérias, incluindo todas as Enterobacteriaceae, fermentam a glicose através da via de Embden-Meyerhof, para formar ácido pirúvico. Entretanto, o modo pelo qual o piruvato é utilizado varia entre as espécies, podendo seguir pela via dos ácidos mistos ou pela via butileno glicólica (ou do butileno glicol). O teste de VM e VP tem o objetivo de realizar a diferenciação entre essas duas vias. As bactérias que utilizam a via dos ácidos mistos são VM positivas, e as que utilizam a via butileno glicólica são VP positivas.

O meio utilizado para o teste é líquido (mistura de peptona, fosfato de potássio e glicose) e, normalmente, distribuído em tubos de hemólise. Para cada amostra, são utilizados dois tubos: um para o VM e outro para VP. O meio é o mesmo nos dois tubos, o que diferencia o teste é o revelador utilizado ao final. No tubo indicado para VM, pinga-se algumas gotas de vermelho de metila para verificar a produção, ou não, de ácidos mistos suficientes para manter o pH abaixo de 4,4. No tubo indicado para VP, pinga-se uma solução de hidróxido de potássio (KOH) e, em seguida, algumas gotas de alfa-naftol. A visualização do resultado é a mesma: presença de coloração vermelha. As bactérias que utilizam a via do butileno glicol, como certas cepas do grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia*, produzem apenas pequenas quantidades de ácidos mistos, que podem ser insuficientes para reduzir o pH do meio contendo vermelho de metila e produzir mudança de cor. Em consequência, as espécies de Enterobacteriaceae que são VP positivas são, na maioria das vezes, VM negativas e vice-versa (Figura 2.13).

Figura 2.13 – Tubo indicando reação de VM positiva (esquerdo).

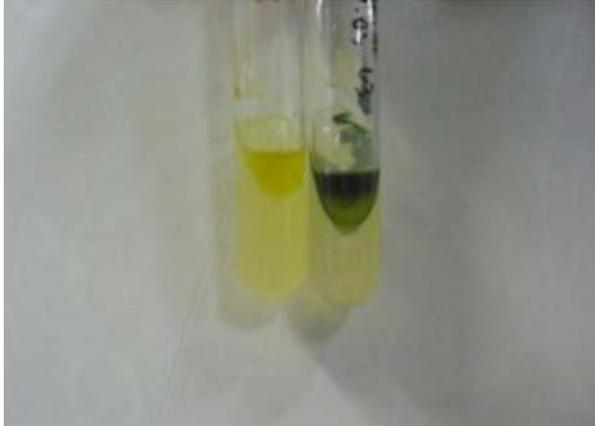


Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar Fenilalanina

O intuito desse meio é aferir a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da ação da fenilalanina desaminase. Esse teste é útil para diferenciação inicial de espécies de *Proteus* sp., *Morganella* sp. e *Providencia* sp. de outros bacilos Gram-negativos. Apenas os membros desses gêneros e alguns microrganismos isolados relativamente raros do grupo *Enterobacter* sp. possuem a enzima responsável pela desaminação oxidativa da fenilalanina. O meio apresenta-se em tubo e com superfície inclinada, a semeadura é feita sem picar o meio. Após um período de incubação de 18 a 24 horas, a leitura do teste é feita por adição de algumas gotas de uma solução de cloreto férrico (10%) sobre o crescimento. O aparecimento de uma cor verde indica positividade da reação (Figura 2.14).

Figura 2.14 – A desaminação da fenilalanina é um teste interessante para detecção inicial de *Proteus* sp., *Morganella* sp. e *Providencia* sp. A positividade da reação é determinada pelo aparecimento de uma coloração verde após adição de uma solução de cloreto férrico.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Caldo base Moeller (Descarboxilação de lisina, arginina e ornitina)

Verifica a capacidade das bactérias de descarboxilar aminoácidos específicos no meio de cultura. Empregam-se normalmente três aminoácidos para identificação dos microrganismos: lisina, arginina e ornitina (tubos separados). A enzima descarboxilase remove moléculas de CO_2 de um aminoácido para formar aminas de reação alcalina. Os produtos aminados específicos são:

lisina → cadaverina

arginina → citrulina

ornitina → putrescina

Vale salientar que a conversão da arginina em citrulina é uma atividade de dihidrolase, e não descarboxilase, na qual o grupo NH_2 é retirado da arginina como primeira etapa; em seguida, a citrulina é convertida em ornitina, que sofre descarboxilação para gerar putrescina.

Os aminoácidos são dissolvidos em um meio líquido chamado caldo base Moeller. Quando se efetua o teste da descarboxilase, deve-se incluir sempre um tubo controle sem aminoácido (apenas a base), para assegurar que a bactéria em avaliação está viável. Uma mudança de cor do indicador púrpura de bromocresol no tubo controle para amarelo indica que as bactérias em crescimento metabolizaram a pequena quantidade de glicose no meio para produzir ácidos. Um pH abaixo de 5,5 é a condição ideal para a ação das enzimas descarboxilases. Caso a bactéria analisada possua uma descarboxilase para o aminoácido teste, essa reação irá alcalinizar o meio, devolvendo sua cor púrpura original. Sendo assim, a positividade do teste é dada pela presença de cor púrpura, após o período de incubação (Figura 2.15).

Figura 2.15 – Tubos teste para descarboxilação de aminoácidos. Note a camada de óleo mineral acima do meio, para gerar ambiente anaeróbico. Da esquerda para a direita temos: Controle (deve sempre ficar amarelo), lisina, arginina e ornitina. Para a bactéria analisada, apenas a Ornitina foi positiva (*Proteus mirabilis*). É importante que, para atestar positividade, além da presença de cor púrpura, seja verificada turvação do meio.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Após a realização das provas de identificação (ou provas bioquímicas), utilizando uma tabela como a mostrada a seguir (Tabela 2.2), pode-se chegar à identificação do gênero ou espécie bacteriana.

Tabela 2.2 – Tabela para identificação de espécies de enterobactérias em percentual de positividade.

Bactérias/Provas	Índol	Citrato	H2S	Ureia	Lisina	Arginina	Ornitina	Motil.	Gás Glicose	Lactose	Esculina
<i>Citrobacter freundii</i>	33	78	78	44	0	67	0	89	89	78	0
<i>Citrobacter diversus</i>	99	99	0	75	0	80	99	95	98	50	1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	100	95	5	85	0	85	95	95	97	35	5
<i>Edwardsiella tarda</i>	99	1	100	0	100	0	100	98	100	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	0	2	98	0	98	97	100	93	30
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	100	0	65	0	97	96	95	100	95	98
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	0	20	0	0	0	85	20	40	60
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	99	0	93	90	0	100	90	98	55	97
<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	99	0	1	0	99	91	96	98	99	100
<i>Escherichia coli</i>	98	1	1	1	0	17	65	95	95	95	35

Bactérias/Provas	Indol	Citrato	H2S	Ureia	Lisina	Arginina	Ornitina	Motil.	Gás Glicose	Lactose	Esculina
<i>Escherichia coli inattiva</i>	80	1	1	1	40	3	20	5	5	25	5
<i>Shigella dysenteriae</i>	45	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	50	0	0	0	0	5	0	0	3	1	0
<i>Shigella boydii</i>	25	0	0	0	0	18	2	0	0	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	2	98	0	0	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	98	0	95	98	0	0	0	97	98	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	95	0	90	99	2	98	0	97	100	100
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	30	0	10	40	6	3	0	50	30	80
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
<i>Morganella morganii</i> grup	95	0	20	95	0	0	96	0	90	1	0

Bacterias/Provas	Indol	Citrato	H2S	Ureia	Lisina	Arginina	Ornitina	Motil.	Gás Glicose	Lactose	Esculina
<i>Proteus mirabilis</i>	2	65	98	98	0	0	99	95	96	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	98	15	95	95	0	0	0	95	85	2	50
<i>Proteus penneri</i>	0	0	30	100	0	0	0	85	45	1	0
<i>Providencia rettgeri</i>	99	95	0	98	0	0	0	94	10	5	35
<i>Providencia stuartii</i>	98	93	0	30	0	0	0	85	0	2	0
<i>Providencia alcalifaciens</i>	99	98	0	0	0	0	0	96	85	0	0
<i>Salmonella spp</i>	1	95	95	1	98	70	97	95	96	1	5
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	97	0	98	3	0	97	0	1	0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	25	50	0	95	95	55	100	95	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	10	0	0	15	95	95	99	0	0

Bactérias/Provas	Indol	Citrato	H2S	Ureia	Lisina	Arginina	Ornitina	Motil.	Gás Glicose	Lactose	Esculina
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	100	0	90	10	1	0	0	0	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	100	10	95	0	90	0	0
<i>Salmonella</i> outras	1	90	100	0	99	70	99	99	100	V	0 ou 15
<i>Serratia marcescens</i>	1	98	0	15	99	0	99	97	55	2	95
<i>Serratia marcescens</i> bio	0	30	0	0	55	4	65	17	0	4	96
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	90	0	3	95	0	95	95	75	10	97
<i>Serratia rubidae</i>	0	95	0	2	55	0	0	85	30	100	94
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	0	0	75	0	0	95	2	5	5	25

Fonte: Adaptada do Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde da ANVISA (2004).

Cocos Gram-positivos

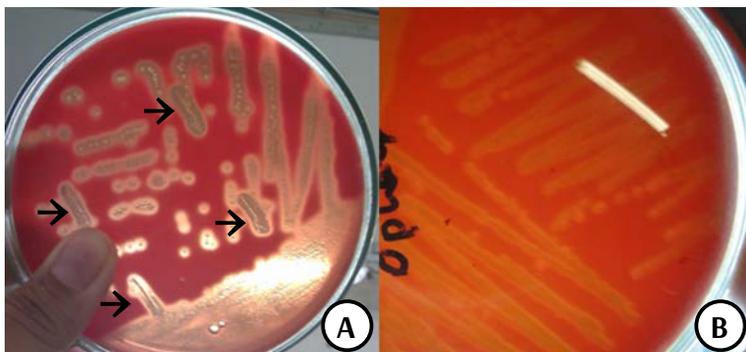
Isolamento

Os cocos Gram-positivos são exemplos de bactérias frequentemente isoladas de amostras clínicas. Por essa razão, dependendo do quadro clínico do paciente, meios como ágar sangue e ágar manitol salgado (em caso de suspeita de *Staphylococcus aureus*) são muito utilizados para o semeio primário de amostras.

Ágar Sangue

Meio enriquecido com 5% de sangue de carneiro. Além de ser altamente nutritivo, propiciando o crescimento da maioria das bactérias de interesse clínico, o ágar sangue também tem uma característica diferencial. A conservação das hemácias íntegras favorece a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a escolha dos testes complementares e diferenciais do gênero *Streptococcus* (Figura 2.16).

Figura 2.16 – A - Bactéria beta-hemolítica (*Streptococcus pyogenes*). É possível perceber a lise completa das hemácias ao redor das colônias. Atentar para os stabs (setas) realizados para verificação da atividade máxima da estreptolisina O (lábil ao oxigênio). B - Bactéria alfa-hemolítica (*Streptococcus pneumoniae*). Lise parcial das hemácias, produzindo uma coloração cinza-esverdeada ou acastanhada.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Ágar Manitol Salgado

Meio seletivo para o isolamento e identificação de estafilococos patogênicos a partir de amostras clínicas, alimentos e triagem de portadores nasais de *Staphylococcus aureus*. A elevada concentração de sal nesse meio (7,5%) inibe o crescimento de outras bactérias, com exceção dos enterococos. A degradação do manitol com formação de ácido está correlacionada com a patogenicidade do gênero em questão e serve como indicador presuntivo da presença de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, outras espécies de estafilococos isoladas com pouca frequência também podem fermentar o manitol; sendo assim, as bactérias manitol-positivas isoladas nesse meio devem ser repicadas em ágar sangue e avaliadas quanto à produção de coagulase.

O vermelho de fenol funciona como indicador de pH nesse meio, o qual apresenta normalmente uma coloração rosa-salmão, mas que muda sua cor para amarelo na presença de espécies fermentadoras do manitol (Figura 2.17).

Figura 2.17 – Na placa da esquerda, temos o exemplo de uma bactéria fermentadora do manitol (*S. aureus*). Observe a coloração amarela do meio ao redor das colônias. A placa da direita mostra outra espécie de estafilococos não fermentadora do manitol (*S. saprophyticus*).



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Provas de identificação

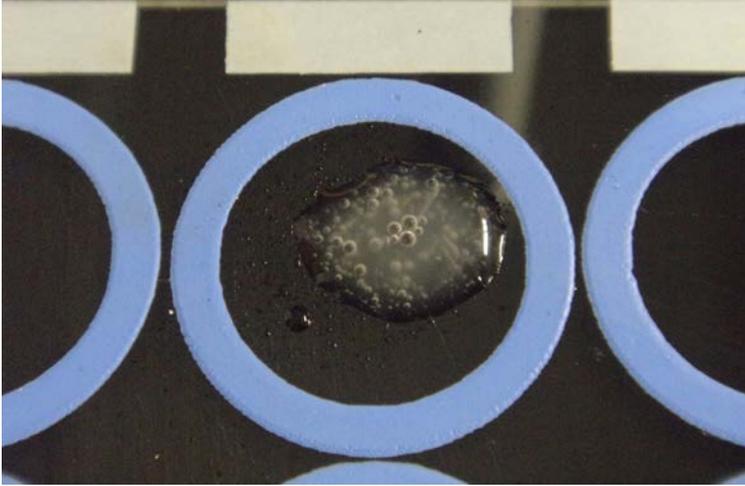
Prova da catalase

As bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* produzem a enzima catalase, capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Esse teste é bem simples, mas de grande valia no esquema de identificação de cocos. No caso de uma amostra cuja suspeita clínica aponte para cocos Gram-positivos, o teste da catalase deve ser o primeiro a ser realizado após o isolamento primário. Isso permite separar, imediatamente, os estafilococos dos estreptococos e enterococos.

O teste da catalase deve, preferencialmente, ser realizado em colônias não provenientes de meio ágar sangue (ou qualquer meio que possua sangue em sua composição), porquanto as hemácias apresentam catalase, o que poderia gerar um falso -positivo. Caso o microbiologista seja mais cauteloso e consiga remover apenas a parte superior da colônia, o teste pode sim ser realizado sem maiores problemas (recomenda-se remover a colônia com um palito de madeira estéril).

Para a execução do teste, deve-se preparar uma pequena suspensão do crescimento bacteriano em água destilada ou salina, na superfície de uma lâmina de vidro bem limpa, e adicionar uma a duas gotas de peróxido de hidrogênio 3%. A positividade do teste é dada pela formação imediata de bolhas na suspensão bacteriana (efervescência) (Figura 2.18).

Figura 2.18 – Reação catalase positiva. Observe a efervescência provocada pela ação da catalase sobre o peróxido de hidrogênio. Para fins didáticos, realizamos a fotografia em uma placa de fundo escuro, mas na prática clínica, essa prova é normalmente realizada em lâmina.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Prova da coagulase

O teste da coagulase em tubo continua sendo o procedimento de referência para identificação de *S. aureus*. Esse teste é também chamado de teste da coagulase livre, uma vez que detecta a enzima secretada extracelularmente, ao contrário da prova realizada em lâmina, chamada de coagulase ligada.

O meio recomendado consiste em plasma de coelho com EDTA. Toma-se uma alçada do crescimento bacteriano obtido após repique, 0,5 ml de cultura pura em caldo, ou pode-se também utilizar colônias típicas diretamente da placa de ágar sangue ou ágar manitol salgado do isolamento primário, transferindo-as para um tubo contendo 0,5 mL de plasma diluído. É interessante, se possível, realizar amostras controle de culturas coagulase positiva e negativa, especialmente quando

se tratar de uma nova partida de plasma. Os tubos devem ser incubados a 37°C e observados a cada 1 hora nas 4 primeiras horas de incubação. Os testes negativos, após esse período, devem ser mantidos à temperatura ambiente, para que uma nova leitura seja realizada após 18 a 24 horas. É importante salientar que a leitura do teste após um tempo prolongado a 37°C pode conduzir a resultados falso-negativos, devido à propriedade de algumas amostras de *S. aureus* produzirem uma fibrinolinsina que dissolve o coágulo formado. A positividade da reação é dada pela formação de um coágulo, de qualquer intensidade (Figura 2.19). O teste é negativo, quando não se observam traços de fibrina coagulada. Normalmente, o coágulo é visível nas primeiras horas de incubação.

Figura 2.19 – Tubos contendo plasma de coelho. Observe a reação de coagulação presente no tubo mais acima. As verificações durante o tempo de incubação devem ser feitas de forma cuidadosa, inclinando o tubo para observar a formação do coágulo.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Boa parte dos laboratórios clínicos considera o fluxo fermentação do manitol → catalase (+) → coagulase (+) suficiente para liberação do resultado como *Staphylococcus aureus*. Acrescentando-se a essas observações apenas o teste de sensibilidade para MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente).

Sensibilidade à novobiocina

No caso de estafilococos coagulase negativos, o passo seguinte na chave de identificação é o teste de sensibilidade à novobiocina. Esse teste representa um método útil para a identificação de *Staphylococcus saprophyticus* (novobiocina resistente). É um método simples que consiste em um miniteste de sensibilidade estilo Kirby-Bauer realizado com um disco de novobiocina 5µg. As cepas resistentes apresentam halos de 6 mm até 12 mm, enquanto as cepas sensíveis exibem halos a partir de 16 mm.

Sensibilidade à bacitracina

Teste utilizado para identificação presuntiva de estreptococos beta-hemolíticos do grupo A. O semeio deve ser feito em ágar sangue (ou Mueller-Hinton sangue). Não existe necessidade de ser realizada turvação na escala 0,5 de MacFarland, basta que se utilize uma suspensão recém-turvada em caldo BHI ou TSB. A positividade do teste é dada pela formação de um halo de qualquer tamanho ao redor do disco de bacitracina (0,04 unidades).

Sensibilidade à optoquina

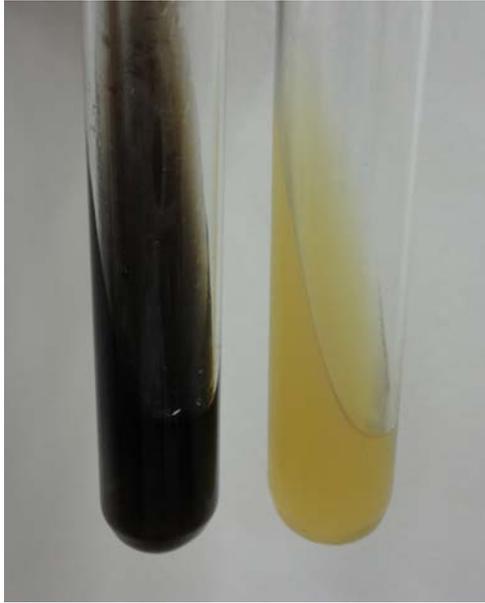
A sensibilidade à optoquina é utilizada para diferenciar *S. pneumoniae* dos demais estreptococos alfa-hemolíticos, por exemplo, *S. viridans*. Assim como no caso do teste da bacitracina, o semeio deve ser realizado em meio contendo sangue. Após a semeadura e adição de um disco de optoquina (5 µg), a placa deve ser incubada em jarra com vela acesa (para gerar um ambiente

de microaerofilia) ou estufa com atmosfera de 5 a 7% de CO₂. A positividade do teste é dada pela formação de um halo de 14 mm ou mais ao redor do disco e identifica o microrganismo como pneumococo.

Prova da bile-esculina

Teste utilizado para identificação presuntiva de espécies de *Enterococcus* e estreptococos do grupo D. O meio apresenta-se em tubo com superfície inclinada. A semeadura é feita na superfície (sem picar o meio). Os microrganismos bile-esculina positivos hidrolisam a esculina em presença de 1% a 4% de sais biliares. A esculina é um derivado da cumarina, composto de uma molécula de glicose e uma de aglicona-esculetina, unidas por uma ligação de oxigênio. As bactérias que crescem promovem a hidrólise desta molécula, com a formação de glicose e esculeteína, que por sua vez reage com o sal de ferro contido no meio (citrato férrico), provocando um escurecimento difuso no meio (Figura 2.20). A maioria das espécies de *Enterococcus* e estreptococos do grupo D enegrece o meio de bile-esculina em 24 horas; raramente, algumas cepas podem exigir uma incubação de 48 horas para que a reação se torne aparente. Vale salientar que essa prova não é suficiente para diferenciar os enterococos, sendo necessária a utilização de outras provas (PYR, crescimento em NaCl 6,5% ou sorologia).

Figura 2.20 – Tubo da esquerda mostrando forte reação positiva no meio bile-esculina, quando comparado ao meio em sua cor original.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Bacilos Gram-negativos não fermentadores

Isolamento

Amostras clínicas, normalmente, são semeadas primariamente nos meios McConkey e ágar Sangue. O microbiologista pode suspeitar de que um bacilo Gram-negativo desconhecido que cresce em algum desses (ou nos dois) meios seja membro do grupo não fermentadores, caso ele apresente ausência de evidências de fermentação da glicose (o que pode ser confirmado pela semeadura em TSI). Nesses casos, o passo seguinte, seria a realização de provas específicas para não fermentadores. Nesse grupo, podemos destacar dois gêneros de grande importância clínica: *Pseudomonas* (Figura 2.21) e *Acinetobacter*.

Figura 2.21 – *Pseudomonas* sp. semeada em McConkey. Colônias lactose negativa. Atenção para o aspecto difuso das colônias. Embora cheirar placas não seja procedimento diagnóstico, é sabido que colônias de *Pseudomonas* apresentam odor característico, alguns o descrevem como “cheiro de uva”. O odor acaba dando uma pista a mais quando se está lidando com esse tipo de bactéria.



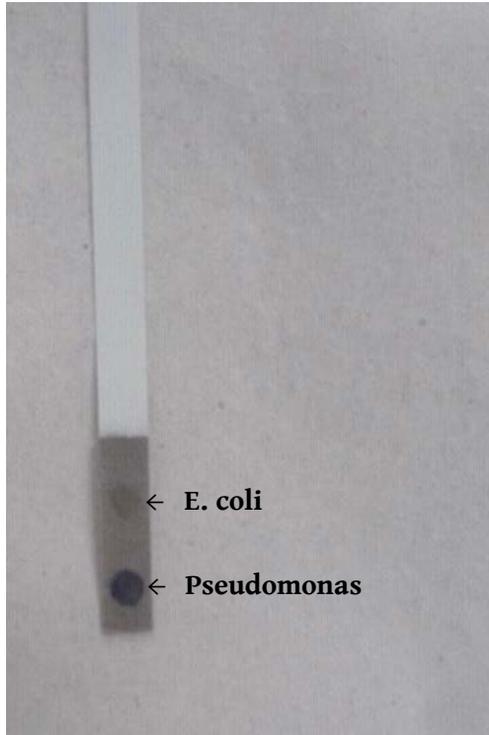
Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Provas de identificação

Prova da oxidase

Essa prova é simples e de fácil realização. Existem fitas comerciais que podem ser utilizadas para esse fim. Basta escolher uma colônia a partir da placa de McConkey ou ágar sangue, retirá-la da placa com um palito de madeira (preferencialmente), e esfregar a colônia na área de teste na tira (papel de filtro saturado com o reagente), tal como foi feito na figura a seguir. A positividade do teste é dada pelo aparecimento de uma coloração arroxeada, indicando atividade de citocromo oxidase (Figura 2.22).

Figura 2.22 – Fita teste para oxidase: observe que foram realizados dois testes na mesma tira com o intuito de demonstrar a diferença entre uma bactéria oxidase negativa (*E. coli*) e positiva (*Pseudomonas* sp.).



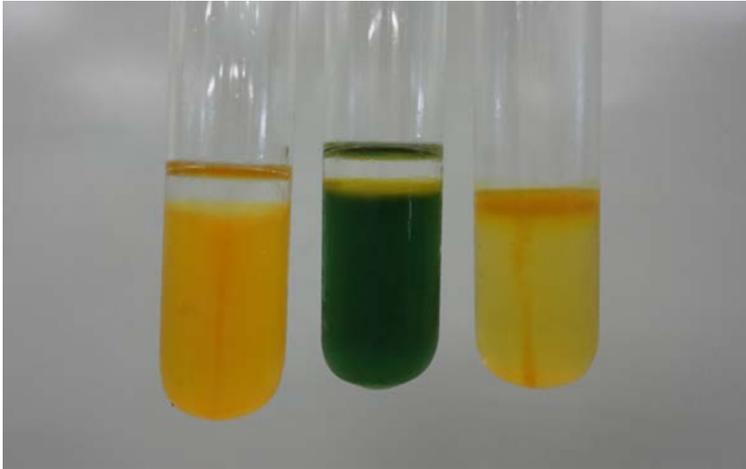
Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Meio base para oxidação e fermentação – OF

Verifica a capacidade da bactéria em utilizar os carboidratos pela via oxidativa ou fermentativa. O meio OF pode ser utilizado como base para verificar a metabolização de diversos açúcares: glicose, frutose, lactose, maltose, manitol, sacarose, xilose. Basta que seja adicionado ao meio base o açúcar que se deseja testar. Normalmente, utiliza-se o OF-GLICOSE. Nesse teste, são necessários dois tubos de cada meio de carboidrato. Utiliza-se um tubo fechado (contendo uma camada de óleo

mineral) e um tubo aberto (sem óleo mineral), a bactéria teste deve ser semeada em picada nos dois tubos. As bactérias oxidativas produzem ácidos apenas no tubo aberto (exposto ao oxigênio atmosférico); as bactérias fermentadoras produzem ácidos em ambos os tubos; e as bactérias não sacarolíticas permanecem inertes nesse meio. O indicador é o azul de Bromotimol; a cor amarela indica fermentação (Figura 2.23).

Figura 2.23 – Meio OF-glicose. O primeiro tubo (esquerda) foi semeado com bactéria fermentadora (*E. coli* - tubo aberto não mostrado). O tubo central e o tubo aberto foram semeados com *Pseudomonas aeruginosa*. Observe que bactérias oxidativas não são capazes de fermentar a glicose no tubo fechado, preservando a cor original do meio (verde).



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Produção de pigmento

Os não fermentadores produzem diversos pigmentos, alguns dos quais são úteis para identificar uma espécie. No caso da *Pseudomonas* sp., gênero de grande prevalência em amostras clínicas, é importante destacar a produção de pio-cianina (Figura 2.24).

Figura 2.24 – Placa de ágar Mueller-Hinton. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos para *Pseudomonas aeruginosa* produtora de pirocianina (pigmento esverdeado).



Fonte: Foto de Maria Eduarda Costa (LABMIC-DMP-CB-UFRN).

Motilidade

Para essa finalidade, pode-se utilizar o SIM (mencionado anteriormente). Entretanto, existe uma peculiaridade, quando da realização desse teste para não fermentadores, pois essas bactérias tendem a crescer apenas na superfície. Por esse motivo, ao se empregar um meio de ágar semissólido deve-se efetuar uma sementeira em picada apenas nos 4 mm superiores do meio, devendo-se fazer uma leitura inicial dentro de 4 a 6 horas. Muitas cepas móveis de não fermentadores mostram apenas uma área nebulosa fraca e precoce próxima à superfície do ágar, que tende a desaparecer com incubação prolongada, daí o porquê de se ter um cuidado especial na leitura dessa prova para esse tipo de bactéria. As leituras devem ser repetidas dentro de 24 e 48 horas para detectar a motilidade de cepas de crescimento mais lento.

Descarboxilação

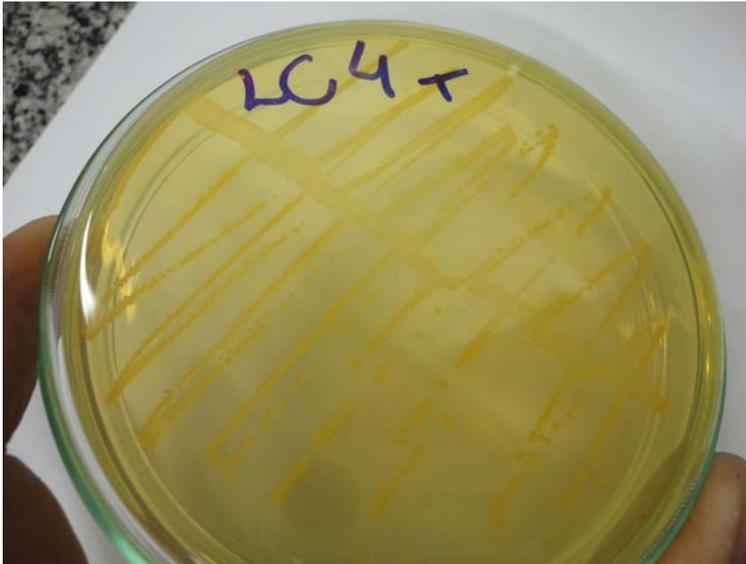
A exemplo da motilidade, a prova da descarboxilação também exige atenção especial, quando realizada para não fermentadores. A conversão inicial do meio numa cor amarela, à medida que os ácidos se acumulam a partir da pequena quantidade de glicose no meio, não é observada para essas bactérias; os parâmetros finais das reações são lidos comparando-se a intensa reação de cor púrpura alcalina com a tonalidade mais clara azul-esverdeada do tubo controle.

Entendendo a fase analítica de espécimes clínicos frequentes na rotina bacteriológica

Urocultura

O meio de escolha para o semeio de amostras de urina é o ágar CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient). O fato desse meio ser deficiente em eletrólitos impede a formação do característico véu em amostras de *Proteus* sp. O CLED tem uma coloração original azul-clara (esverdeada); nesse meio, as colônias lactose positivas são amareladas e as lactose negativas têm cor azul. A principal peculiaridade com relação ao exame microbiológico de urina está na forma de semeio, a qual deve ser quantitativa utilizando alça calibrada (Figura 2.25).

Figura 2.25 – Semeio quantitativo em ágar CLED de cepa lactose positiva.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

No semeio quantitativo, a alça bacteriológica calibrada (1 μL ou 10 μL) é introduzida em uma amostra de urina bem homogeneizada, fazendo-se movimentos para cima e para baixo verticalmente. A alça carregada é então utilizada para inocular o meio de cultura, fazendo-se, inicialmente, uma linha reta no centro da placa (correspondente ao diâmetro da placa) e completando-se o espalhamento com uma série de passagens em ângulo de aproximadamente 90° (em relação à estria inicial). A identidade da bactéria isolada na urocultura é um dos fatores indicativos de infecção, pois existem bactérias que podem normalmente colonizar a porção distal do trato urinário sem causar infecções (microbiota local). Sendo assim, a quantificação é um aspecto essencial do exame bacteriológico da urina.

O critério de diagnóstico de Kass (1956) determina a contagem $\geq 10^5$ UFC/ml como limite indicativo de infecção urinária. No caso de mulheres apresentando infecção urinária sintomática não complicada, este limite corresponde a uma alta especificidade e uma baixa sensibilidade. Cerca de um terço das pacientes com síndrome clínica de disúria, frequência, urgência e piúria e que melhoram com o uso de antibióticos, apresentam contagens entre 10^2 a 10^4 UFC/ml, segundo critério de Stamm (1983). Portanto, atualmente, torna-se necessário que os laboratórios utilizem tanto o critério tradicional, quanto o critério de Stamm, principalmente no caso de pacientes do sexo feminino. O resultado da urocultura deve ser avaliado juntamente com outros dados laboratoriais, como o sumário de urina (pesquisa de bacteriúria e/ou piúria) e clínicos (presença ou ausência de sintomas, fatores predisponentes, população de risco etc.).

Após o semeio e quantificação, os passos de identificação seguintes serão direcionados dependendo das características morfológicas das colônias e morfotintórias (coloração de Gram) da amostra em questão. Normalmente, os passos são os anteriormente comentados para enterobactérias, cocos Gram-positivos ou não fermentadores.

Hemocultura

O termo bacteremia significa a presença de bactérias na corrente sanguínea. Uma vez que é um sítio essencialmente estéril, a presença de microrganismos viáveis em amostras de sangue tem alta relevância do ponto de vista clínico. A determinação do agente etiológico associado a uma bacteremia pode fazer toda a diferença no esquema terapêutico e, conseqüentemente, na evolução clínica e prognóstico do paciente. Por essa razão, os cuidados para a liberação de um resultado rápido e fidedigno devem ser tomados desde o momento da coleta até a liberação do laudo.

Como é comum na rotina de microbiologia a presença de microrganismos contaminantes, é um grande desafio a ser superado. A realização de coleta adequada, por flebotomista bem treinado, pode manter os índices de contaminação das culturas dentro dos aceitáveis 1 a 3%. No caso da hemocultura, tem-se uma complicação relacionada ao isolamento de *Staphylococcus coagulase-negativos* (SCN). Por estar presente na microbiota da pele, durante muito tempo o crescimento desse tipo de bactéria em hemoculturas foi considerado contaminação, mas, com o passar dos anos, a ocorrência de bacteremias verdadeiras causadas por SCN demanda do microbiologista um olhar mais atento a essas ocorrências.

Para evitar contaminações, após a escolha da veia a ser punccionada, a área deve ser limpa com álcool etílico 70%, essa limpeza deve ser reforçada com a aplicação de outro agente antisséptico à base de iodo (como PVPI a 10%) ou clorexidina. Deixe secar e não toque novamente o local da punção. Limpe com álcool 70% a tampa do frasco de hemocultura. Realize a coleta com seringa e agulha descartáveis e transfira o sangue para o frasco apropriado sem trocar a agulha. Homogeneíze os frascos por inversão. Identifique-os adequadamente e encaminhe rapidamente para o laboratório. O ideal é que a coleta seja feita antes que o paciente inicie a antibioticoterapia, o microbiologista deve estar atento para o fato de que nos pacientes em tratamento a chance de positividade é diminuída.

Existem divergências quanto ao número de amostras necessárias para cada paciente, mas recomenda-se que sejam realizadas no mínimo duas até quatro amostras, o que permite o isolamento do agente bacteriano em mais de 95% dos eventos. Vale salientar que cada amostra será semeada em dois frascos (tradicionalmente um aeróbico e outro anaeróbico). Amostras diferentes devem ser preferencialmente coletadas de sítios diferentes (braço esquerdo, braço direito). O volume a ser colocado em cada frasco depende do fabricante. Com relação

ao volume total analisado por paciente, estudos mostram um bom rendimento com 30 ml de sangue. Por exemplo, se forem coletados dois conjuntos de frascos com 10 ml cada (total de 40 ml), o critério será satisfeito.

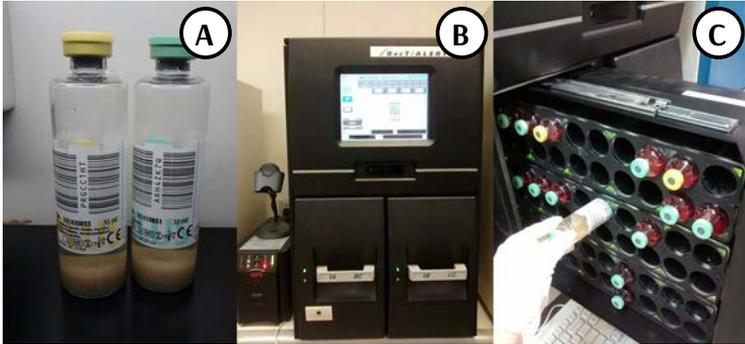
Os frascos para hemocultura estão disponíveis comercialmente e os meios utilizados são enriquecidos nutricionalmente, tais como caldo infusão cérebro coração (BHI), caldo Columbia ou caseína digerida de soja (TSB). Após a coleta, existem diferentes sistemas para processar a hemocultura. Os métodos manuais incluem os frascos convencionais, os frascos com dispositivos acoplados e a lise centrifugação. Além da metodologia manual, a fim de processar as hemoculturas de forma mais eficiente, foram criados sistemas automatizados. A grande vantagem da metodologia automatizada é que ela evita a frequente manipulação da amostra, diminuindo a chance de contaminação da mesma e do operador, e otimiza o tempo de liberação do resultado.

Nas metodologias convencionais, ou de monitoração visual, os frascos de hemocultura devem ser incubados a 35 °C e examinados periodicamente para evidenciar os sinais de crescimento bacteriano: turvação do meio, colônias crescendo na camada de sangue sedimentada, produção de gás, hemólise. O período de incubação é de 7 dias durante o qual são feitos subcultivos. O primeiro subcultivo pode ser feito 12 a 18 horas após início da incubação da amostra, preferencialmente em placa de ágar chocolate (pode ser usado ágar sangue). Devem ser feitos subcultivos de todas as amostras coletadas de um paciente. Após o primeiro subcultivo, a inspeção visual dos frascos deve ser feita diariamente à procura de sinais de crescimento. Caso seja verificado crescimento, a amostra deve ser subcultivada imediatamente e preparada uma lâmina de Gram. Posteriormente, deve ser feita a determinação do agente etiológico, utilizando os passos anteriormente comentados para enterobactérias, cocos Gram-positivos ou não fermentadores e realização do antibiograma. A

grande maioria das bactérias é isolada nas primeiras 72 horas e a sua identificação tem valor preditivo importante.

A implantação de sistema automatizado para hemocultura depende muito da rotina e porte do laboratório, que precisa justificar o investimento de alto custo. Razão pela qual os métodos manuais ainda são muito empregados. Como exemplo de sistema de hemocultura automatizado, citaremos o *BacT/ALERT*[®]. Foi um dos primeiros sistemas de monitoramento contínuo implementado. A detecção do crescimento bacteriano é feita com base na detecção de CO₂ produzido através de um sensor presente na base do frasco. Quando o CO₂ é produzido, a cor do sensor muda de verde para amarelo, gerando um alerta sonoro ou visível, e a posição do frasco é indicada pelo computador (Figura 2.26). Uma das grandes vantagens da automação em relação aos métodos manuais é aumento na rapidez para liberação dos resultados, pois geralmente os protocolos são de 5 dias de incubação e a grande maioria dos resultados positivos podem ser detectados nas primeiras 48 horas.

Figura 2.26 – Sistema automatizado para hemocultura *BacT/ALERT*®. A – Frascos para hemocultura. O de tampa amarela destina-se à coleta pediátrica (menor volume). B – Equipamento. Cada unidade de dados serve como incubadora, misturador e dispositivo de detecção. C – Cada frasco é colocado com fundo para baixo em uma cuba receptora.



Fonte: Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises do Hospital Universitário Onofre Lopes – UFRN. Créditos das fotos: Jéssica Teixeira Jales (estudante de Biomedicina).

Cultura de ponta de cateter

A patogenia da infecção de corrente sanguínea é multifatorial, podendo ocorrer por contaminação da solução de infusão, nas conexões entre o cateter e as linhas de infusão, no sítio de inserção e/ou por colonização endógena do cateter. As hemoculturas, preferencialmente, não devem ser coletadas a partir de cateter, a menos que para diagnóstico de infecção relacionada a esse dispositivo.

As infecções relacionadas ao acesso vascular são de grande importância clínica. No caso de pacientes internados que apresentem sinal de infecção, mas ausência de qualquer foco infeccioso pode-se suspeitar de infecção do cateter. Tipos de cateteres nos quais é possível realizar a cultura: central, periférico, arterial, Swan-Ganz e Hickman.

A cultura semiquantitativa da superfície do cateter (Método de Maki) é o método mais utilizado para determinar a relação entre colonização do cateter e a infecção. No momento de remoção do cateter, os mesmos cuidados tomados durante a inserção devem ser adotados. A pele em volta deve ser cuidadosamente limpa com solução de iodo (PVPI), e o excesso removido com álcool etílico a 70%. Um segmento distal (que estava inserido na pele do paciente), de aproximadamente 5 cm é assepticamente cortado com tesoura estéril, colocado em frasco seco e enviado ao laboratório à temperatura ambiente (20 a 25°C) no prazo de 1 hora ou até 12 horas, se refrigerado.

Caso o segmento de cateter chegue ao laboratório com tamanho maior que o indicado, utilize uma tesoura estéril para cortar o excesso. Em seguida, utilizando uma pinça estéril, o cateter é rolado (evitar esfregar) 4 a 5 vezes sobre a superfície de uma placa de ágar sangue.

Após incubação (18-24 horas, 37°C), a detecção de 15 ou mais UFC é correlacionada com o fato do cateter constituir a fonte de infecção. Técnicas quantitativas pareadas ou não com hemocultura periférica são mais específicas que a técnica semiquantitativa. A vantagem da técnica de cultura quantitativa (hemoculturas coletadas simultaneamente por meio do cateter e por venopunção) é que não será necessária a remoção do cateter se o procedimento não implicar bacteremia relacionada ao cateter.

Líquor

Devido à importância vital do sistema nervoso central, à gravidade do quadro clínico e à urgência por se tratar de um sítio normalmente estéril, o líquido (LCR) deve ter máxima prioridade, devendo ser processado imediatamente. Avalie e anote o volume e o aspecto do LCR.

O volume mínimo recomendável para coleta é de 1-2 ml, que será utilizado na bacterioscopia, pesquisa de antígenos e cultura. Caso o serviço não tenha plantão de microbiologia, a cultura pode ser semeada, 5 a 10 gotas, diretamente durante a punção em tubos contendo o meio ágar chocolate, ágar sangue e caldo tioglicolato (esse último, em caso de suspeita de bactéria anaeróbia). No caso de exame direto e cultura de fungos, o volume recomendado é de 2 ml (caso exista indicação). Mesmo volume recomendado para coloração de Ziehl e cultura para micobactérias (se indicado). Para provas virológicas, o volume recomendado é 2-3 ml (caso haja indicação).

Realize a cultura em ágar chocolate e ágar sangue. Incubar em 5 a 10% de CO₂, a 35-36°C. A primeira leitura deve ser feita em 24 horas (se positivo, informar ao médico imediatamente), se positiva fazer identificação e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (segundo as normas vigentes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI). Caso a cultura esteja negativa, reincube e faça leituras diárias até completar 72 horas.

Quando da realização da cultura de líquido, outros parâmetros devem ser avaliados para uma interpretação correta do achado microbiológico, tais como a celularidade, o nível de glicose e proteínas. A contagem normal de leucócitos no líquido é < a 5 células /mm³, todas mononucleares. Na meningite bacteriana está aumentada com predomínio inicial de polimorfonucleares (>80%), podendo aparecer linfócitos subsequentemente. Valores de glicose menores que 30 mg/dl ou menos que 50% dos níveis séricos, em 50% dos pacientes, sugerem meningite bacteriana, fúngica ou por micobactérias. Valores de proteínas acima de 100 mg/dl indicam provável infecção bacteriana.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA ou Antibiograma) fornece o padrão de susceptibilidade de uma espécie bacteriana frente a diferentes classes de antibacterianos. A escolha dos antibacterianos está diretamente associada com o tipo de organismo isolado. Existem quatro técnicas recomendadas para a avaliação do perfil de sensibilidade bacteriano, são elas: técnicas de microdiluição, macrodiluição, Etest e difusão em ágar. As três primeiras apresentam como meta traçar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco capaz de destruir e/ou de impedir o crescimento bacteriano. A técnica de disco difusão em ágar (Kirby-Bauer) fornece um resultado qualitativo do potencial antibacteriano por meio da ausência, presença ou presença reduzida de um halo de inibição de crescimento.

O método de Kirby-Bauer

Com uma alça bacteriológica toca-se a superfície de 4 a 5 colônias bacterianas de aspecto similar, afim de obtenção do inóculo. Após a realização desse processo, transferir esse inóculo para um tubo contendo 5ml de solução salina estéril, ajustando a turvação para 0,5 da escala Mac Farland, que corresponde a uma quantidade de 10^8 UFC/ml. Submergir a essa suspensão um *swab*, antes de retirá-lo, eliminar todo o excesso de líquido, pressionando-o contra a parede interna do tubo. Em seguida, realize um semeio do tipo difusão na placa de ágar

Muller-Hinton, de modo a cobrir todo o espaço da superfície do ágar com a suspensão bacteriana (Figura 2.27).

Figura 2.27 – Preparo da suspensão bacteriana conforme escala 0,5 Mac Farland (10^8 UFC/ml) e semeio pela técnica de distensão.



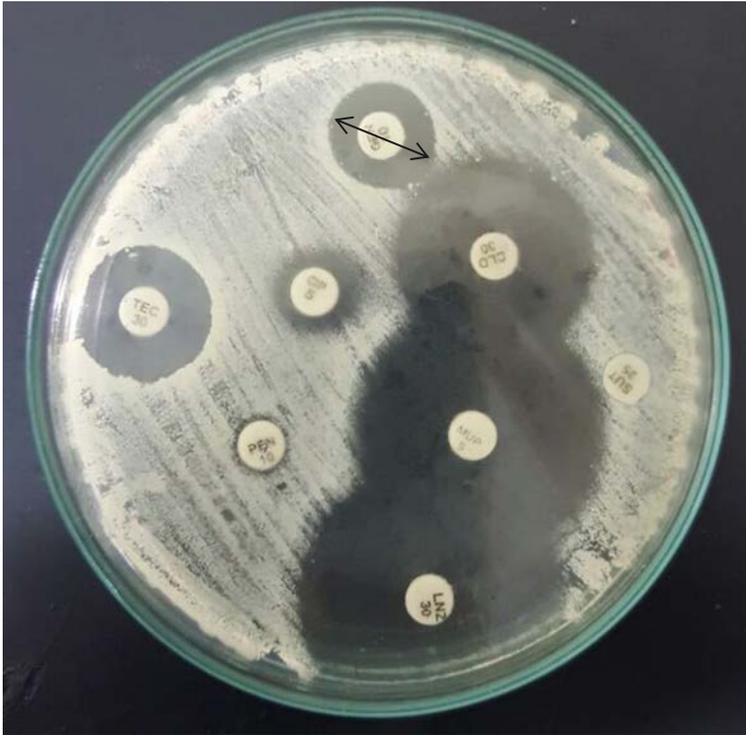
Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.

Passado este procedimento, recolocar a tampa da placa e deixar em repouso por 5 minutos para a secagem do ágar, antes da colocação dos discos de antibióticos. A escolha do antibacteriano deverá obedecer às recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Os discos de antibióticos devem ser colocados de forma manual sobre a superfície do meio, com auxílio de pinça estéril, respeitando um distanciamento de 20mm um do outro. Feito isso, os discos devem ser pressionados à superfície do meio com a ponta da pinça. Após esta etapa, as placas devem ser incubadas em estufa bacteriológica em temperatura de 35°C por um período de 18h.

Passado o período de incubação, faz-se a medição do diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco de antibiótico, caso esta seja formada (Figura 2.28).

Figura 2.28 – Leitura do diâmetro do halo de inibição formado após incubação de 18h a 35°C.



Fonte: Foto de Maria Eduarda Costa (Laboratório de Micobactérias, DMP, CB, UFRN).

Antibacterianos recomendados para teste pela técnica de Kirby-Bauer para os organismos bacterianos mais frequentes no laboratório clínico de acordo com CLSI:

- Enterobacteriaceae: Penicilinas, Penicilinas associadas a inibidores de betalactamases, Cefalosporinas, Carbapenêmicos, Monobactâmicos, Fluorquinolonas, Aminoglicosídeos, Glicopeptídeos, Macrolídeos, Tetraciclina, Inibidores de folato, Fencóis, Fosfomicinas e Nitrofuranos.

- *Pseudomonas Aeruginosa*: Penicilinas, Penicilinas associadas a inibidores de betalactamase, Cefalosporinas, Carbapenêmicos, Monobactâmicos, Fluorquinolonas e Aminoglicosídeos.
- *Acinetobacter* sp.: Penicilinas, Penicilinas associadas a inibidores de betalactamase, Cefalosporinas, Aminoglicosídeos, Fluorquinolonas, Inibidores de folato e Tetraciclina.
- *Staphylococcus* sp.: Fluorquinolonas, Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina, Nitrofurantóina, Lincosamidas, Cloranfenicol, Rifampicina, Linezolida e Teicoplanina, Cefoxitina (30µg).

Resistência bacteriana a antimicrobianos

O conhecimento do fenômeno de resistência bacteriana data do início da era microbiana. Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidades terapêuticas, observou-se que determinadas populações bacterianas expostas a diferentes agentes sobreviviam a essa exposição.

Fleming, descobridor da penicilina, foi o primeiro a observar tal fenômeno em 1929. Hoje se sabe que espécies bacterianas podem apresentar duas formas de resistência, a natural ou intrínseca e a forma adquirida. A resistência bacteriana adquirida é sem dúvida a forma mais preocupante, essa é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias e já são conhecidos muitos dos mecanismos envolvidos nesses processos. Sabe-se também, que a capacidade das bactérias serem resistentes a diferentes antibacterianos não é uma propriedade nova ou particular de determinada espécie. Fatores como uso empírico de antibacterianos contribuem de forma considerável para o surgimento destes fenômenos de resistência.

As bactérias têm a capacidade de se comunicar entre indivíduos da mesma espécie e ou de espécies diferentes, em que por meio dessa interação procariota ocorre a transferência de elementos genéticos móveis capazes de modificar tanto a sua estrutura celular como levá-la a produzir substâncias capazes de neutralizar a ação dos antibacterianos.

Vários são os mecanismos de resistência desenvolvidos, entre eles se destacam: a capacidade de reduzir purinas, impedindo a penetração do fármaco na célula bacteriana; a super expressão de bomba de efluxo, promovendo a expulsão do fármaco da célula bacteriana; a modificação de estruturas responsáveis pela formação da parede celular, como as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e a produção de enzimas capazes de promover a hidrólise dos fármacos, como as betalactamases.

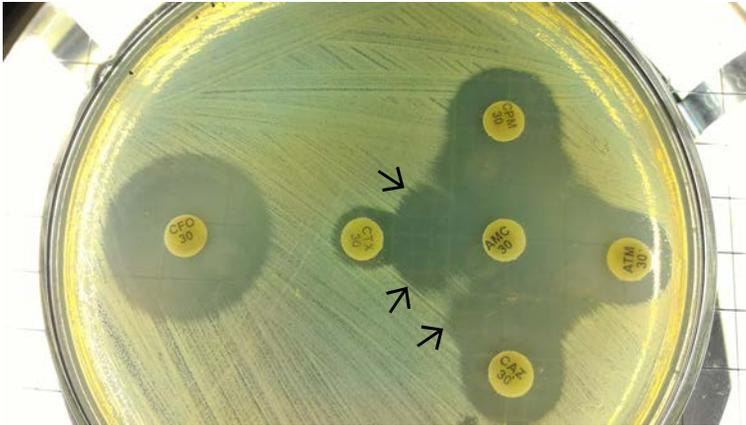
Confirmação fenotípica de alguns mecanismos de resistência bacteriana

Sabe-se que o principal mecanismo de resistência desenvolvido por bacilos Gram-negativos é a produção de betalactamases. São espécies de bacilos Gram-negativos: Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

Betalactamases de espectro estendido (ESBL)

Mecanismo presente, sobretudo, em espécies pertencentes à família das Enterobacteriaceae. Essas betalactamases são caracterizadas por promoverem a hidrólise de cefalosporinas de terceira geração, são sensíveis à cefoxitina, hidrolisam o Aztreonam e, por apresentarem um grupo serina como componente estrutural, possuem sensibilidade aos inibidores de betalactamases. Observa-se que a grande maioria das ESBLs hidrolisa também as cefalosporinas de quarta geração. Sua confirmação pode ser observada com uso da técnica do disco aproximação (Figura 2.29).

Figura 2.29 – Formação de sinergismo no segmento entre os fármacos (setas) caracteriza a suspeita para ESBL positiva. Atentar para a sensibilidade à cefoxitina (CFO). AMC = Amoxicilina+ácido clavulânico; CTX = Cefotaxima; ATM = Aztreonam; CAZ = Ceftazidima; CPM = Cefepime.



Fonte: Laboratório de Ensino de Microbiologia, DMP, UFRN.
Klebsiella pneumoniae CCBH3858 (coleção: FIOCRUZ).

Produção de AmpC

A produção de betalactamases do tipo AmpC caracteriza-se por promover hidrólise das cefalosporinas de terceira geração, hidrolisa cefoxitina e é sensível a cefalosporinas de quarta geração. Apesar de sua pesquisa no laboratório clínico não ser tão frequente, este mecanismo inspira cuidados, principalmente quando está associado a outros mecanismos, sobretudo, os de produção enzimática.

Existem dois tipos de produção AmpC: a forma plasmidial, podendo ser encontrada em todas as espécies de Bacilos Gram-negativos e o cromossômico (induzível), frequente em espécies pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. e *Providencia* sp.). Sua identificação fenotípica dá-se pela formação de uma zona de entroncamento, formada quando se aproximam discos de cefalosporinas de terceira geração com discos de carbapenêmicos (Figura 2.30).

Figura 2.30 – Observar a zona de entroncamento formada com a aproximação das cefalosporinas de terceira geração com o carbapenêmico.



Fonte: Laboratório de Micobactérias, DMP, UFRN.

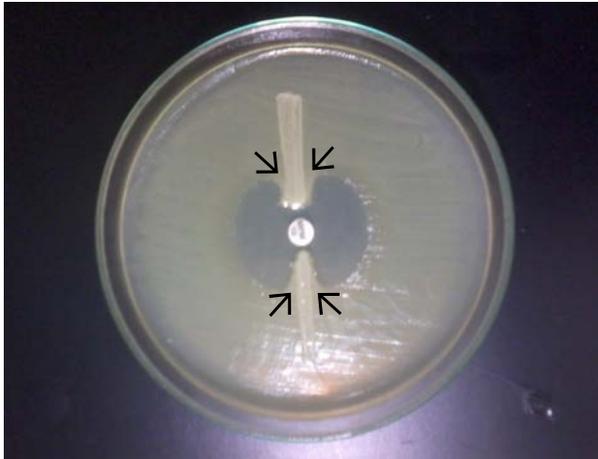
Grupo Carbapenemases

As cepas produtoras de carbapenemases apresentam resistência a todos os betalactâmicos. De acordo com sua diversidade bioquímica estrutural, esse grupo subdivide-se em: carbapenemases que apresentam um grupamento serina em seu sítio ativo e carbapenemases que apresentam um íon zinco em seu sítio ativo. Dentro deste grupo, destacam-se as formas: IMP (Imipenemases), VIM (Verona metallo Betalactamase), NDM (Nova Delhimetallo Betalactamase), OXA (Oxacilinase), SPM (São Paulo Betalactamase) e a KPC (Carbapenemase), sendo essa última a única que apresenta um grupo de aminoácido serina em seu sítio ativo.

Grupo KPC

Este grupo de carbapenemases apresenta uma sensibilidade *in vitro* aos inibidores de betalactamases. Fenotipicamente a determinação desse grupo é feita pelo teste de Hodge Modificado (MHT), o qual é realizado a partir do semeio em placa de ágar Mueller-Hington, por distensão, de uma suspensão (0.5 Mac Farland) de *Escherichia coli* (ATCC25922), acompanhado de repique na forma de estria vertical de colônia suspeita para produção de KPC-2 e um controle positivo (*Klebsiella pneumoniae* CCBH4955). Após as etapas de semeio, deve-se adicionar ao centro da placa um disco de Ertapenem, incubando em seguida a placa a uma temperatura de 35°C por um período de 18h. Define-se como prova MHT positiva a formação de um trevo nas bordas da estria do inóculo suspeito (Figura 2.31).

Figura 2.31 – Ao fundo, semeio de suspensão de cepa *Escherichia coli* ATCC25922, e estrias de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC-2. O crescimento da cepa de *E. coli* em direção ao halo de inibição, formado pela presença do disco de Ertapenem ou meropenem, indica que a cepa pesquisada produz carbapenemase. Nota: O Ertapenem é o disco mais sensível para confirmação de produção de carbapenemase.



Fonte: Laboratório de Micobactérias, DMP, UFRN.
Klebsiella pneumoniae CCBH4955 (coleção: FIOCRUZ).

Recomendações do CLSI 2015 para o teste MHT

Enterobacteriaceae: não susceptível a um ou mais carbapenêmicos testados.

Limitações: apresentam resultados falsos positivos, quando ocorrem isolados com produção de ESBL ou AmpC com redução de porina, são também observados resultados falso negativos para bactérias produtoras de NDM carbapenemase, recomenda-se apenas para espécies pertencentes a família das enterobacteriaceae.

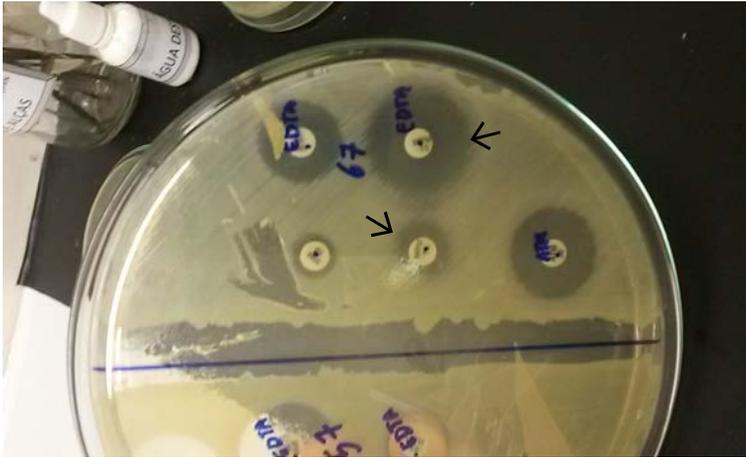
Grupo MBL

Bactérias produtoras de Metallo-beta-lactamases que apresentam em sua unidade estrutural um íon Zn^{2+} . Apresentam um complexo perfil de resistência a todas as classes de betalactâmicos, apresentando uma sensibilidade *in vitro* ao Aztreonam. Este tipo de mecanismo de produção de carbapenemase, muitas vezes, está associado a outros diferentes mecanismos de resistência como os de modificação estrutural (redução de porina) e superexpressão de bomba de efluxo. No laboratório clínico, utiliza-se a prova de inativação iônica (quelação) por meio da utilização de uma solução padronizada de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para a confirmação fenotípica deste mecanismo.

Prova do EDTA

Prepara-se uma suspensão (0,5 Mac Farland) da bactéria suspeita, semeia em ágar Mueller-Hinton. Em seguida, acrescenta-se um disco de carbapenêmico (Ertapenem) de um lado da placa, paralelo a esse disco acrescenta-se outro disco de carbapenêmico (Ertapenem) saturado com uma gota da solução de EDTA. Após esse processo, incubar a 35°C por 18h. Assim, a formação de halo e ou aumento de 5mm no halo formado pela ação do disco saturado com EDTA caracteriza-se como prova positiva (Figura 2.32).

Figura 2.32 – Prova do EDTA. Observar o aumento acima de 5mm no diâmetro do halo após adição da solução de EDTA.



Fonte: Laboratório de Micobactérias, DMP, UFRN.

Staphylococcus sp.

Historicamente, a resistência do gênero *Staphylococcus* a diferentes classes de antibióticos já vem sendo documentado desde a descoberta das penicilinas. Diversos são esses mecanismos como produção de betalactamases, resistência à oxacilina (mediada pelo gene *MecA*), resistência à ceftoxitina, resistência induzível à clindamicina e resistência à vancomicina e são largamente investigados na rotina laboratório clínico. O CLSI de 2015 define que todas as cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (ORSA) e/ou *Staphylococcus* coagulase negativo (CONS) resistentes à oxacilina são considerados resistentes a outras classes de betalactâmicos.

Detecção da resistência à oxacilina

Para avaliar a resistência à oxacilina é recomendado o semeio de uma suspensão (0,5 MacFarland) da colônia de

Staphylococcus aureus suspeita em ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6µg/ml de oxacilina. Prepara-se o inóculo, transferindo para um tubo contendo 5ml de salina estéril. Em seguida, saturar o swab nessa suspensão e semear por toda a superfície da placa. Feito isso, incubar em estufa bacteriológica por 18h a 35°C. Presença de crescimento indica presença de gene MecA, conferindo resistência à oxacilina. Outra forma de se avaliar uma possível resistência é a realização do teste de triagem em placa de ágar Mueller-Hinton com disco de cefoxitina (30µg).

Detecção da resistência à vancomicina

Conforme sinalizado pelo manual CLSI, não se recomenda a técnica de disco difusão para avaliação do seu potencial de susceptibilidade. Recomenda-se o cálculo da Concentração Inibitória Mínima, ou realizar triagem de crescimento em ágar suplementado com 6µg/ml de vancomicina. Presença de crescimento sobre a superfície após incubação a 35°C por 18h indica resistência à vancomicina.

Teste D

Amostra de *S. aureus* com resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina apresentam um resultado de Teste D negativo. Já o teste D positivo indica resistência induzível à clindamicina, podendo levar à falha terapêutica com seu uso (Figura 2.33).

Figura 2.33 – Teste D positivo. Cepa de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Laboratório de Ensino em Microbiologia (LEM, UFRN).

Referências

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. Brasília: ANVISA, 2004.
- CARRARA, D. Comentários a respeito da última atualização Guideline do CDC para a prevenção de infecções relacionadas a cateteres intravasculares. *Informativo BD, IntraVenous*, São Paulo, v. 8, maio/dez. 2002.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M02- M07*. USA: CLSI, 2015.
- HENRY, J.B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1999.
- HOOTON, T. M.; STAMM, W.E. Diagnosis and treatment of Uncomplicated Urinary Tract infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* v. 11, n. 3, p. 551-581, set. 1997.
- KASS, E.H. Asymptomatic infection soothe urinary tract. *Trans. Ass. Am. Phys.*, v. 69, p. 56-63, 1956.

- KONEMAN, Elmer et al. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KIRBY, W.M.M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant Staphylococci. *Science*, v. 99, n. 2579, p. 452-453, jun. 1944.
- MAKI, D. G.; WEISE, C. E.; SARAFIN, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter related infection. *N Engl J Med*, v. 296, p. 1305-1309, 1977.
- OPLUSTIL, Carmem Paz et al. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
- SANTOS FILHO, Lauro. *Manual de microbiologia*. 4. ed. João Pessoa: UFPB, 2006.
- STAMM, W.E. Measurement of piuria and its relation to bacteriuria. *Am J Med*, v. 7, Suppl. 1B, p.53-58, 1983.

Capítulo 3

Enteroparasitos

—

Profa. Dra. Cecília Maria de Carvalho Xavier Holanda

O exame parasitológico de fezes

O exame parasitológico de fezes (EPF) é a análise laboratorial feita a partir de uma amostra das fezes, buscando detectar a presença de formas evolutivas de parasitos no intestino humano, bem como determinar o seu tipo. É ainda o procedimento mais aplicado no diagnóstico laboratorial da maioria dos enteroparasitos. Para que seu resultado seja corretamente avaliado, se faz necessário seguir recomendações quanto à coleta, armazenamento e transporte do material fecal. O parasito é um ser que somente sobrevive em associação com o seu hospedeiro, do qual retira sua nutrição e abrigo, podendo viver fora ou dentro deste, espoliando-o de seu alimento.

Muitos parasitos vivem na luz do intestino humano e a sua existência pode ser detectada pela análise das amostras fecais. As parasitoses intestinais são próprias de países com más condições de saneamento básico, uma vez que a maioria desses parasitos é transmitida ao homem, via oral, pelo contato com as fezes das pessoas infectadas através da água, solo, mãos, alimentos, fômites etc.

No Brasil, as enteroparasitoses mostram prevalências bastante diferentes em várias regiões do país e vários fatores podem interferir na sua distribuição, como a presença de hospedeiros susceptíveis, a falta de higiene, a taxa de migração humana, a precária condição de vida de muitas populações e a amostra analisada. O conjunto desses fatores somado ao

íntimo contato com a terra, ao hábito de andar descalço, de consumir carne bovina ou suína crua ou malcozida e de criar animais de forma inadequada, tornam as populações de baixa renda, principalmente, vulneráveis a essas doenças parasitárias. Dentro desse contexto, destaca-se a região Nordeste, onde as parasitoses intestinais são ainda muito comuns, sobretudo, em função do saneamento básico deficiente e da falta de educação sanitária das populações.

As parasitoses intestinais ainda representam, portanto, um problema médico-sanitário de grande importância, tanto pela frequência com que ocorrem quanto por causarem, algumas vezes, acometimentos orgânicos capazes de incapacitar os indivíduos infectados, reduzindo a resistência do organismo, predispondo-o, inclusive, a outras infecções. Devido à importância das parasitoses intestinais para o homem, é necessário que seja feito um diagnóstico acurado, reconhecendo bem sua morfologia à luz de um microscópio óptico, por meio de métodos ou técnicas sensíveis e específicas, tanto individualmente quanto em populações como um todo, como no caso de estudos epidemiológicos. Sendo assim, do ponto de vista morfológico, há dois grupos de parasitas que podem habitar o intestino humano:

Protozoários: organismos unicelulares, microscópicos, com espécies patogênicas e apatogênicas para o homem. Morfologicamente, eles se apresentam na forma de cistos, oocistos e trofozoítos.

Helmintos: organismos pluricelulares, patogênicos, geralmente macroscópicos, de tamanhos variáveis, que vão desde alguns milímetros até alguns metros. Morfologicamente, eles se apresentam na forma de ovos, larvas e vermes adultos.

Devido aos diversos parasitos terem características biológicas diferentes, nem sempre o mesmo tipo de exame é indicado para todos. Para detectar alguns deles, devem ser utilizados

outros métodos ou técnicas que não o exame parasitológico de fezes. Mesmo em relação ao exame parasitológico das fezes, alguns métodos/técnicas podem detectar a maioria dos parasitos, mas outros requerem procedimentos mais específicos e, por isso, o médico deve também indicar qual o método/técnica desejada, de acordo com sua suspeita clínica. Para melhor qualidade dos resultados, o exame deve ser feito em pelo menos três amostras de fezes, coletadas em dias diferentes ou consecutivos (dependendo da suspeita clínica), visto que um resultado negativo em uma só amostra não garante a inexistência de parasitos, haja vista que ela é só uma pequena parcela das fezes totais e que a infecção parasitária pode ser de pequena intensidade.

Coleta e preservação do material fecal

A detecção e identificação dos parasitos intestinais estão em relação direta com a qualidade da amostra fecal coletada e entregue no laboratório. Assim, há necessidade de instruir o paciente, pois sem explicações pormenorizadas podem ocorrer erros na coleta, tais como a contaminação com urina, terra, água e quantidade inadequada de fezes. Essas devem ser colhidas em um recipiente (frasco coletor) limpo e seco, o qual deve ser de plástico, com boca larga e tampa de rosca. Deve-se recolher cerca de 5 a 10g de fezes recentemente emitidas (frescas). Não sendo possível observar esta orientação, as fezes devem ser preservadas em formalina a 5% ou 10%, ou no conservante MIF (mertiolato-iodo-formaldeído). O médico poderá solicitar a coleta de três amostras em dias alternados e, para isso, o laboratório fornecerá um frasco contendo o conservante para a preservação das fezes.

As soluções conservantes rotineiramente mais usadas são:

a) Solução de formaldeído a 10%:

Formaldeído 40%.....10ml

Água destilada-deionizada aq.s.p.....100ml

b) Solução de mertiolato-iodo-formaldeído (MIF):

Glicerina.....2ml

Formaldeído 40%.....10ml

Tintura de mertiolato 1:1000.....80ml

Água destilada-deionizada aq.s.p.....100ml

c) Solução de lugol:

Cristais de iodo ressublimado..... 5g

Iodeto de potássio.....10g

Água destilada-deionizada q.s.p.....100ml

Exame macroscópico das fezes

O exame macroscópico das fezes deve preceder o exame microscópico. Além de poder contar com indicadores da presença de helmintos (proglotes e/ou vermes adultos pequenos), ele também fornece informações quanto à consistência, cor e odor das fezes, presença ou não de sangue ou muco, restos alimentares, entre outros.

A consistência das fezes está diretamente ligada à quantidade de água que estas contêm, e são classificadas em: fezes formadas, semiformadas, pastosas ou diarreicas e líquidas ou disentéricas. Na conduta metodológica é importante a determinação da consistência do material fecal, principalmente em relação aos estágios de diagnóstico dos protozoários, pois os trofozoítos são usualmente diagnosticados nas fezes disentéricas ou líquidas, nas mucossanguinolentas e, algumas vezes,

nas pastosas; enquanto que os cistos são encontrados mais comumente nas fezes formadas ou semiformadas e também nas pastosas. Os oocistos são encontrados em fezes de qualquer consistência. Os ovos e as larvas de helmintos, geralmente, podem ser diagnosticados em todos os tipos de amostras fecais, entretanto, nas fezes líquidas se encontram em pequeno número, exceto nos casos da estrongiloidíase disseminada em que é visualizado um elevado número de larvas de *Strongyloides stercoralis* durante a crise disentérica da fase aguda da doença.

Exame microscópico das fezes

Principais cuidados que devem ser observados para evitar erros no diagnóstico coproparasitológico

- a) Uso incorreto do microscópio (altura do condensador de luz, limpeza das objetivas e oculares, por exemplo).
- b) Esfregaços inadequadamente preparados.
- c) Observação muito rápida das preparações.
- d) Escolha inadequada do método ou técnica de acordo com a suspeita clínica.
- e) Falta de conhecimento das várias espécies e dos diferentes tipos de artefatos (resíduos vegetais como células, pelos, fibras e vasos espiralados; fibras musculares; fios de gaze; ovos de helmintos e cistos de protozoários de vida livre – não parasitários – e/ou de animais; ácaros; grãos de pólen; grãos de amido, esporos vegetais; gotículas de gorduras e de ar etc.) presentes no material fecal.
- f) Desconhecimento da necessidade de amostra adicional.
- g) Incapacidade para identificação de determinados tipos e/ou formas evolutivas dos parasitas humanos.

Técnicas e métodos utilizados rotineiramente no exame de fezes

A utilização simultânea de três métodos ou técnicas com diferentes sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de enteroparasitos tem a finalidade de aumentar a eficiência no diagnóstico e, portanto, diminuir os resultados falso-negativos. O exame microscópico permite visualizar os estágios de desenvolvimento dos protozoários (cistos, trofozoítos, oocistos) e dos helmintos (ovos, larvas e vermes pequenos). Os mais utilizados rotineiramente são:

Método direto e exame a fresco

O exame a fresco permite visualizar a motilidade de trofozoítos dos protozoários intestinais em fezes liquefeitas, recém-emitidas, analisadas em até 20 minutos após a evacuação. O método consiste em se fazer um fino esfregaço da amostra fecal com um bastão de vidro ou um palito de madeira estéril, sobre uma lâmina, adicionar uma gota de solução fisiológica, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio de luz com aumento de 400x.

No método direto, para a identificação de cistos e/ou oocistos de protozoários e de ovos e/ou larvas de helmintos a preparação deve ser corada com lugol.

Técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ, 1934) ou de Lutz (1919) ou da sedimentação espontânea

É utilizada para a pesquisa de cistos, oocistos, ovos e larvas de parasitos intestinais. Fundamenta-se na sedimentação espontânea das formas parasitárias, presentes nas fezes, em água, sob ação da gravidade. A técnica de HPJ é indicada para recuperação de ovos considerados pesados como os ovos inférteis *Ascaris lumbricoides* e *Schistosoma mansoni*. A técnica consiste em homogeneizar 5 a 10 gramas de fezes em um cálice graduado

contendo 20 ml de água destilada, filtrar essa suspensão em gaze dobrada 4 vezes para um cálice de sedimentação, completar o volume do cálice com água destilada e deixar sedimentar por 2 horas. Após esse período, decantar o sobrenadante e, ao sedimento, adicionar 3-4 gotas de solução de lugol. Fazer um esfregaço desse sedimento em uma lâmina de microscopia e observá-lo em aumento de 100x (pesquisar ovos e larvas de helmintos intestinais) e de 400x (pesquisar cistos e oocistos de enteroprotzoários).

Técnica de Faust e colaboradores (1938)

Fundamenta-se na centrífugo-flutuação de cistos, oocistos, ovos leves e, às vezes, larvas de enteroparasitos em uma solução de sulfato de zinco a 33,33% e densidade 1,18 g/mL. Para fezes preservadas, recomenda-se a densidade de 1,20 g/ml. É indicado para a concentração de cistos e oocistos de enteroprotzoários. A técnica consiste em fazer uma suspensão fecal, filtrá-la para um tubo cônico, por meio de gaze dobrada 4 vezes, centrifugar a 2500 rpm (rotações por minuto) durante um minuto, repetindo esse procedimento até que o sobrenadante final esteja quase límpido. Após a última lavagem, desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com solução de sulfato de zinco a 33% recém-preparada. Centrifugar por um minuto a 2500 rpm e “pescar”, com uma alça de platina estéril, os parasitos presentes na tensão superficial formada e colocar sobre uma lâmina de microscopia. Adicionar 1 gota de solução de lugol e visualizar o esfregaço com aumento de 400x. Outro método que pode ser usado é o a **técnica de Ritchie**, a qual se fundamenta na centrífugo-sedimentação de cistos, oocistos, ovos e larvas de enteroparasitos por meio de um sistema formol-éter ou formol-acetato de etila.

Métodos de Baermann-Moraes (1948), Rugai, Mattos e Brizola (1954) e Picanço (1963)

Esses três métodos fundamentam-se no termohidrotropismo positivo de larvas de nematelmintos intestinais, como larvas de *Strongyloides stercoralis* e/ou de ancilostomídeos, em água com temperatura entre 42°C e 45°C. Para todos esses métodos recomenda-se que as fezes estejam moldadas ou formadas. Atualmente, os Laboratórios de Parasitologia Clínica utilizam na rotina para a pesquisa de larvas de nematelmintos intestinais, notadamente as de *Strongyloides stercoralis*, apenas o método de Picanço (Carlos Augusto Garcia Picanço), uma modificação do método de Baermann-Moraes. Portanto, descreveremos, a seguir, o procedimento do método de Picanço.

1. Colocar, num cálice de sedimentação de 125 ml, água destilada aquecida entre 42°C-45°C, até 1 cm de distância da borda superior.
2. Numa peneira plástica pequena (diâmetro de 5 cm), colocar cerca de 8 a 10 gramas de fezes moldadas, recentemente emitidas, sobre um pedaço de gaze dobrada 4 vezes, de modo que as fezes fiquem submersas na água tépida.
3. Cobrir as fezes com outro pedaço de gaze ou similar, para evitar contaminação ambiental através de moscas ou insetos.
4. Aguardar 1 hora sem movimentar o cálice (mantê-lo em ambiente sem refrigeração).
5. Após esse tempo, retirar a peneira com as fezes, desprezá-las (fezes) e coletar as possíveis larvas presentes no fundo do cálice por meio de uma pipeta de Pasteur ou similar (canudo plástico, por exemplo).
6. Colocar cerca de 3 ml do líquido coletado em um vidro de relógio pequeno (5 cm de diâmetro).

7. Aguardar cerca de 3 minutos e examinar em um microscópio entomológico ou colocar o vidro de relógio, contendo as possíveis larvas, sobre uma lâmina de microscopia e examinar em um microscópio ótico comum (objetiva de 10x).
8. Após detectar a presença das larvas, proceder à identificação destas: retirar uma gota do líquido coletado, colocar numa lâmina comum, adicionar uma gota de lugol fraco, cobrir com lamínula e observar a morfologia das larvas distinguindo-as entre rabditóides ou filarióides de *S. stercoralis* ou de ancilostomídeos.

Método de Graham (1941) ou método da fita adesiva transparente ou do swab anal

Indicado para o diagnóstico de ovos de *Enterobius vermicularis* e, eventualmente, ovos de *Taenia* sp.. Quando presentes na região anal, as fêmeas de *E. vermicularis* também podem ser vistas na fita adesiva. A coleta do material deve ser feita no período matutino, antes do paciente levantar-se do leito, tomar banho ou defecar. Conhecido ainda como *swab* anal, esse método consiste em pressionar a face colante de uma fita adesiva transparente tipo “durex”, apoiada sobre um abaixador de língua, na região anal/perianal do paciente a fim de aderir, nessa fita, os ovos ou as fêmeas de *E. vermicularis*. Após isso, aderir a fita adesiva, com a parte colante para baixo, sobre uma lâmina de microscopia e examinar diretamente na objetiva de 10x.

Colorações de esfregaços fecais

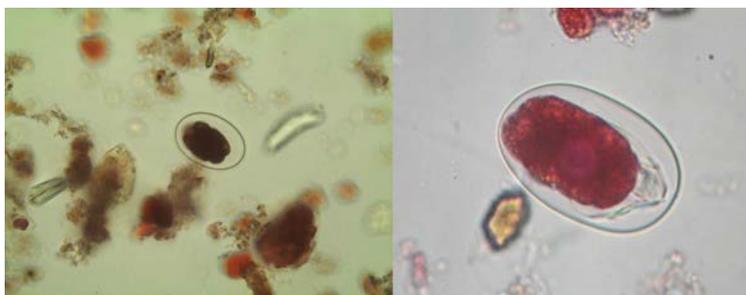
Geralmente, as amostras de fezes encaminhadas, rotineiramente, para os Laboratórios de Parasitologia, públicos ou privados, são processadas pela técnica do Hoffman, Pons e Janer (HPJ) e o sedimento fecal é corado pela solução de lugol.

Formas evolutivas dos principais enteroparasitos no exame de fezes

Ovo de Ancilostomídeo

Este ovo está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Necator americanus* e/ou *Ancylostoma duodenale*, determinando a ancilostomíase, ancilostomose ou amarelão (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Ovos de Ancilostomídeos observados em campo claro nos aumentos de 100x (à esquerda) e 400x (à direita) após coloração pelo lugol.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Schistosoma mansoni*

Este ovo está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Schistosoma mansoni*, ocasionando a esquistossomose mansônica ou barriga d'água (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Ovo de *S. mansoni* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. Setas aponta o espículo lateral.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Hymenolepis nana*

Este ovo está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Hymenolepis nana*, determinando a himenolepíase humana (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Ovo de *H. nana* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. Setas apontando os filamentos polares.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Hymenolepis diminuta*

Raramente encontrado nas fezes humanas, pois é um helminto (cestoda) presente no rato, seu hospedeiro habitual (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Ovo de *H. diminuta* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol.

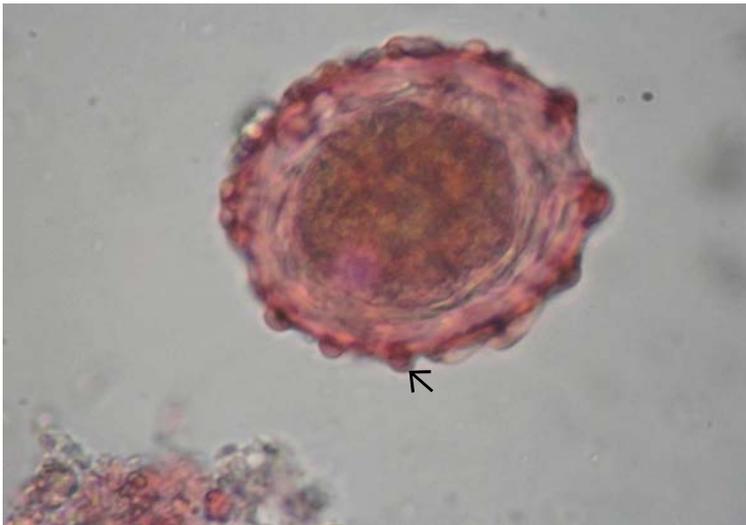


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Ascaris lumbricoides* fértil não embrionado

Este ovo está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Ascaris lumbricoides*, ocasionando a ascaridíase humana (Figura 3.5).

Figura 3.5 – Ovo de *A. lumbricoides* fértil não embrionado observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. Seta aponta para a membrana mamilona da externa.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Ascaris lumbricoides* fértil embrionado (Figura 3.6)

Figura 3.6 – Ovo de *A. lumbricoides* fértil embrionado observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. A seta aponta o embrião.

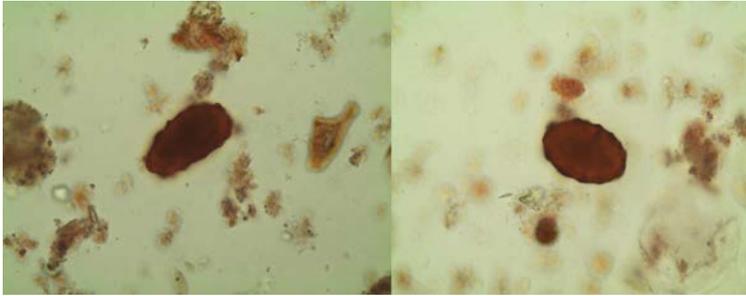


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Ascaris lumbricoides* infértil

Este ovo está sempre presente nas fezes de pacientes com ascaridíase humana causada apenas por fêmeas de *Ascaris lumbricoides* ou quando há fêmeas não copuladas por machos (Figura 3.7).

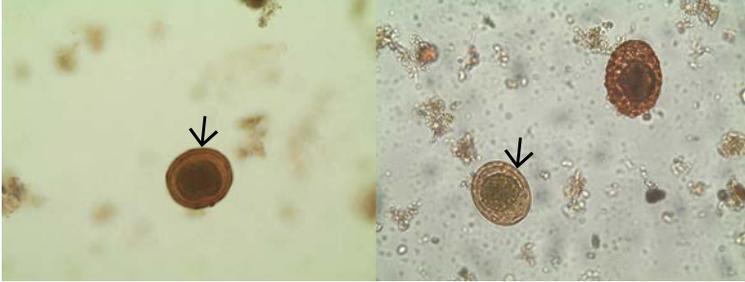
Figura 3.7 – Ovos de *A. lumbricoides* inférteis observados em campo claro no aumento de 100x, após coloração pelo lugol.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Ascaris lumbricoides* fértil decorticado (Figura 3.8)

Figura 3.8 – Ovos de *A. lumbricoides* férteis decorticados (setas) observados em campo claro no aumento de 100x, após coloração pelo lugol. Na foto à direita e acima, observa-se um ovo fértil não decorticado (presença da membrana externa mamilonada).



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Taenia* sp.

Presente nas infecções intestinais humanas causadas pelos helmintos da classe cestoda, *Taenia solium* ou *Taenia saginata*, que ocasionam as teníases humanas (Figura 3.9).

Figura 3.9 – Ovos de *Taenia* sp. observados em campo claro no aumento de 100x (seta) e 400x (à direita), após coloração pelo lugol.

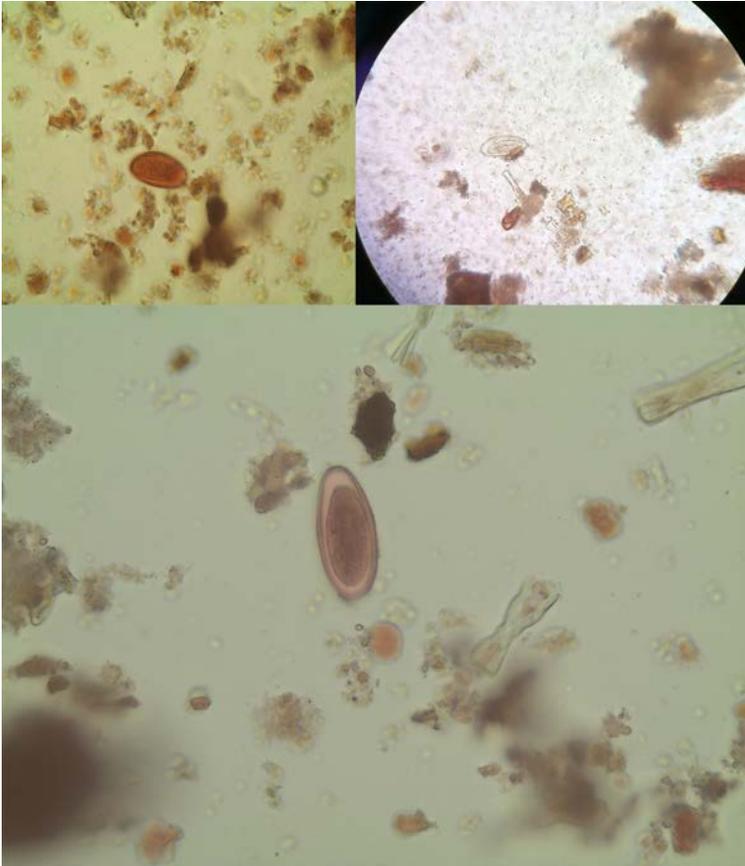


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Enterobius vermicularis*

Este ovo está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Enterobius vermicularis*, ocasionando a enterobiose humana (Figura 3.10).

Figura 3.10 – Ovos de *E. vermicularis* observados em campo claro no aumento de 100x (acima) e de 400x (abaixo), após coloração pelo lugol.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Trichuris trichiura*

Este ovo está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Trichuris trichiura*, ocasionando a tricuríase humana (Figura 3.11).

Figura 3.11 – Ovo de *T. trichiura* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. Setas apontam para os opérculos.

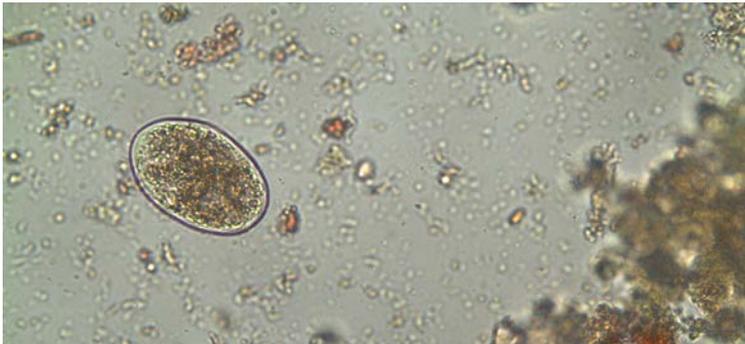


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Ovo de *Diphyllobothrium latum* (tênia do peixe)

O *Diphyllobothrium latum* é um parasito do intestino delgado humano e é conhecido como a “tênia do peixe”. Sua infecção pelo homem decorre do consumo de peixes crus de água doce ou cozidos inadequadamente. O aumento da incidência e a detecção em áreas previamente livres desta parasitose tem se relacionado com a popularização do hábito das pessoas de comerem peixe cru, especialmente o salmão, na forma de *sushi*, *ceviche* e *sashimi*. O verme adulto possui várias proglotes contendo ovos (Figura 3.12) e pode atingir até 25 metros de comprimento. Esses ovos são liberados das proglotes para o interior do intestino grosso do homem, sendo expelidos nas fezes. No meio exterior, o ovo eclode na água doce e libera o embrião, o qual é ingerido por pequenos crustáceos que, por sua vez, são ingeridos pelos peixes. Em seguida, o embrião migra em direção ao músculo do peixe, onde se transforma em larva plerocercóide. Este é o estágio final que é ingerido pelos humanos e crescerá até a forma adulta em 3 a 6 semanas. Uma vez estabelecido, o *D. latum* pode sobreviver por 30 anos ou mais, e o encontro de múltiplos parasitos em um mesmo paciente é comum.

Figura 3.12 – Ovo de *D. latum*.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II. Laboratório de aulas práticas de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Larva de *Strongyloides stercoralis*

Esta larva está sempre presente nas infecções intestinais humanas causadas pelo *Strongyloides stercoralis*, ocasionando a estrogiloidíase humana (Figuras 3.13 a, b e c).

Figura 3.13a – Larva de *S. stercoralis* observada em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Larva de *Strongyloides stercoralis* – esôfago do tipo “rabditoide”

Figura 3.13b – Esôfago rabditoide da larva de *S. stercoralis* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. Seta aponta para o bulbo posterior do esôfago rabditoide.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Larva de *Strongyloides stercoralis* – primórdio genital

Figura 3.13c – Primórdio genital (seta) da larva de *S. stercoralis* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol.

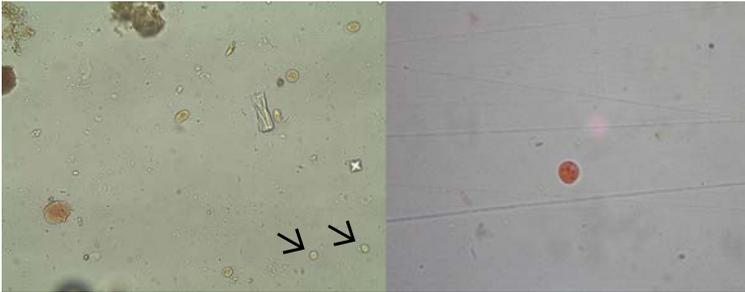


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Cisto de *Endolimax nana*

Protozoário comensal do intestino grosso do homem. É a menor ameba do nosso intestino. Surge em grande número nas fezes humanas em situações onde ocorreu um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Apresenta 4 núcleos puntiformes refringentes (Figura 3.14).

Figura 3.14 – Cistos de *E. nana* observados em campo claro nos aumentos de 100x (setas na esquerda) e 400x (à direita), após coloração pelo lugol e pelo MIF, respectivamente.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Cisto de *Iodamoeba bütschlii*

Protozoário comensal do intestino grosso do homem. Surge em grande número nas fezes humanas em situações onde ocorreu um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Apresenta um grande vacúolo de glicogênio e um único núcleo (Figura 3.15).

Figura 3.15 – Cisto de *I. bütschlii* observados em campo claro nos aumentos de 100x e 400x (seta), após coloração pelo lugol. Seta da direita apontando para o vacúolo de glicogênio.

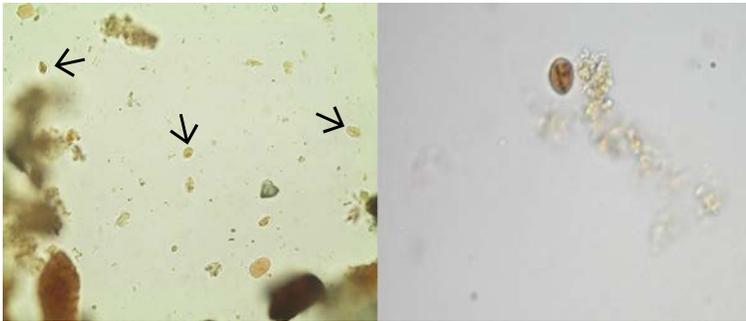


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Cisto de *Giardia lamblia*

A *Giardia lamblia* é um protozoário flagelado patogênico do intestino delgado do homem. Causa a giardíase humana, infecção com crises diarreicas, tenesmo e fortes cólicas abdominais (Figura 3.16).

Figura 3.16 – Cistos de *G. lamblia* observados em campo claro no aumento de 100x (setas à esquerda) e de 400x (à direita), após coloração pelo lugol.

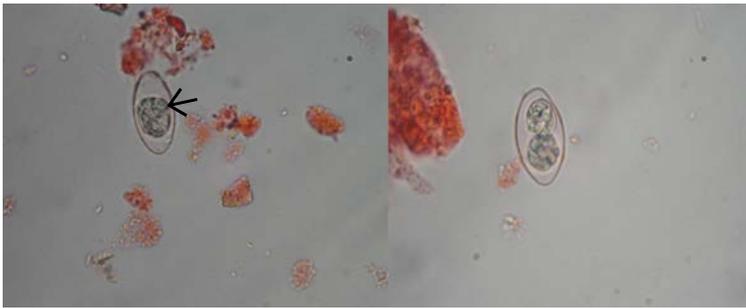


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Oocistos de *Cystoisospora belli*

Cystoisospora belli é um protozoário oportunista do intestino delgado do homem. Causa a cistoisporose humana em indivíduos imunocomprometidos. Nas fezes, podemos encontrar oocistos com 1 (mais frequente) ou 2 esporocistos (Figura 3.17).

Figura 3.17 – Oocistos de *C. belli* observados em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol. O do lado esquerdo possui um esporocisto (seta) e o do direito, dois esporocistos.

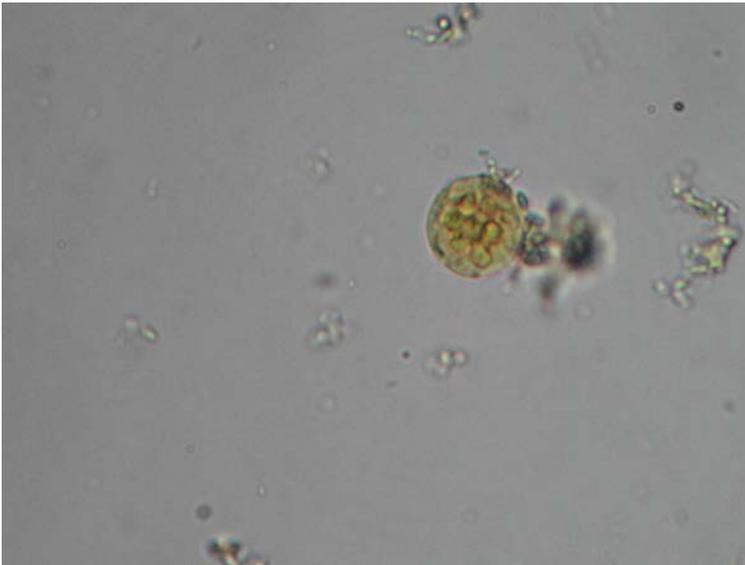


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Cisto de *Entamoeba coli*

Protozoário comensal do intestino grosso do homem. Surge em grande número nas fezes humanas em situações em que ocorrem desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Apresenta de 1 a 8 núcleos com cariossoma volumoso e excêntrico (Figura 3.18).

Figura 3.18 – Cisto de *E. coli* observado em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol.

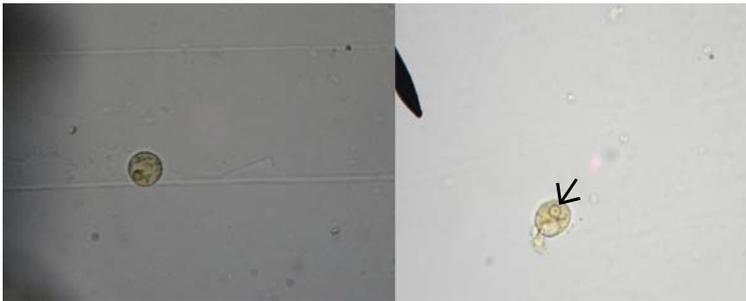


Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Cisto de *Entamoeba histolytica/dispar*

Protozoário comensal da luz do intestino grosso do homem. Ao invadir a mucosa do intestino torna-se patogênico e causa a amebíase intestinal. Ao atingir outros locais, tem-se a amebíase extraintestinal. Possui de 1 a 4 núcleos com cariossoma puntiforme e central (Figura 3.19).

Figura 3.19 – Cistos de *E. histolytica* observados em campo claro no aumento de 400x, após coloração pelo lugol, a seta aponta para o núcleo com cariossoma puntiforme e central.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Cisto de *Chilomastix mesnili*

Protozoário comensal do intestino grosso do homem. Apresenta um único núcleo, tem aspecto piriforme e coloração verde clara. Sua patogenicidade é discutível (Figura 3.20).

Figura 3.20 – Cisto de *C. mesnili* observado em campo claro no aumento de 400x (seta), após coloração pelo lugol.



Fonte: Disciplina de Laboratório Clínico II – Laboratório Escola de Biomedicina, DMP, UFRN. Material clínico (fezes) obtido dos pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Onofre Lopes (LAC/HUOL) da UFRN.

Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 15340*: Laboratório Clínico – exames parasitológicos de fezes. Rio de Janeiro, 2006.
- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben, *Gennesk. Tijds Ned Ind.* v. 57, p. 131-137, 1917.
- DE CARLI, G. A. *Parasitologia Clínica*: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. São Paulo: Atheneu, 2001.

- FAUST, E. C. et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine*, v. 18, p. 169-183, 1938.
- FIORITI, L. S. et al. Avaliação das técnicas parasitológicas no diagnóstico laboratorial de parasitoses intestinais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 34, S1, p. 293, 2001.
- GRAHAM, C. F. A device for the diagnosis of *Enterobius vermicularis*. *American Journal of Clinical Pathology*. v. 21, p. 159-161, 1941.
- HENRY, J.B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1999.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis. *Journal of Public Health*. Puerto Rico, v.9, p. 281-298, 1934.
- LUTZ, A. O. *Schistosomum mansoni* e schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 11, p. 121-125, 1919.
- MELLO, R. T.; ROCHA, M. O.; MOREIRA, M. C. C. G. Exame parasitológico de fezes: estudo comparativo entre os métodos Coprotest, MIFC, Baermann e Kato. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. v. 32, n. 4, p. 289-291, 2000.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. *Revista do Serviço de Saúde Pública (RJ)*, v. 1, n. 3, p. 507-624, 1948.
- OLIVEIRA, L. A. et al. *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- PICANÇO, C. A. G. Diagnóstico da strongiloidíase pelo método de Baermann. *Rev. Fac. Med. UFC*. v. 3, p. 105-112, 1963.
- RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the United States Army Medical Department*. v. 8, n. 4, p. 326, abr. 1948.
- RUGAI, E.; MATTOS, T; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolf Lutz*. v. 14, p. 5-8, 1954.

Os autores

Cecília Maria de Carvalho Xavier Holanda

Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN (1981) com Doutorado em Ciências da Saúde (2004-UFRN), Mestrado em Patologia Tropical pela Universidade Federal do Ceará (1999-UFC) e Especialização em Parasitologia (1996-UFRN) e Análises Clínicas (1992-UFRN). Atualmente é Professora Associada do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências nas Disciplinas de Parasitologia, Helmintologia, Protozoologia, Métodos em Parasitologia, Uroanálises e Introdução ao Laboratório Clínico II da UFRN. Vice-coordenadora da base de pesquisa em Radiobiologia Experimental e Ensaio Antiparasitários Farmacológicos e Toxicológicos Pré-clínicos. Pesquisadora do Laboratório de Ensaio Antiparasitários e de Radiobiologia Experimental (LEARE-UFRN). Possui experiência nas áreas de Parasitologia Humana e Médica (helmintos e protozoários); nas áreas das Análises Clínicas (Parasitologia Clínica, Hematologia, Imuno-hematologia, Microbiologia, Imunologia, Uroanálises e Bioquímica Clínica) e no uso crônico de radiofármacos e sua influência sobre os antiparasitários humanos (sintéticos e/ou biossintéticos) e produtos naturais de uso popular. Desenvolve projetos integrados de Pesquisa, Ensino e Extensão em Parasitologia, com ênfase em Proto-helmintologia Parasitária. E-mail: cechol@ufrnet.br

Dayse Santos Arimateia

Biomédica habilitada em análises clínicas com Mestrado em Bioquímica e Especialização em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Atualmente desenvolve suas atividades no Laboratório Escola de Biomedicina da UFRN, no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências. E-mail: daysantos@ufrnet.br

Renato Motta Neto

Farmacêutico com Mestrado em Patologia e Doutorado em Cirurgia pela Universidade Federal do Ceará - UFC, em 2003 e 2007, respectivamente. Atualmente é Professor Associado das Disciplinas de Microbiologia Médica e Laboratório Clínico do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pesquisador do Laboratório de Micobactérias (UFRN) e Coordenador da Linha de Pesquisa em Bacteriologia médica-Bacilos Gram-negativos: Etiologia e Resistência. Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (UFRN). Desenvolve projetos integrados de Pesquisa, Ensino e Extensão em Microbiologia, com ênfase em Resistência Bacteriana. E-mail: rmotta_net@hotmail.com



Este livro foi projetado pela equipe
editorial da Editora da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte.