

ROTEIRO DE PRÁTICAS MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE MACROSCÓPICA COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM E MICROSCOPIA

INTRODUÇÃO

A avaliação das características macroscópicas das colônias é feita usualmente mediante um exame visual da superfície das placas de ágar. Várias são as características comumente observadas nas colônias, úteis para uma identificação bacteriana preliminar: tamanho, forma, elevação, margem, cor, superfície. Também se pode avaliar quanto à hemólise em ágar sangue, produção de pigmentos em meios de ágar, odor.

Com o fornecimento das condições físico-químicas adequadas obteremos a proliferação de microrganismos *in vitro*, que irão formar massas de células conhecidas como colônias. A inspeção inicial destas colônias para a identificação preliminar das bactérias é uma das pedras fundamentais da microbiologia diagnóstica.

As bactérias e outros microrganismos são normalmente transparentes, o que torna difícil o estudo da morfologia quando são examinados em estado natural.

As preparações microscópicas permitem a obtenção de material adequado ao exame microscópico. Duas técnicas gerais são empregadas para o preparo adequado do material a ser observado: uma utiliza suspensão de microrganismos em meio líquido a fresco (microscopia de campo escuro), e a outra utiliza esfregaços fixados e corados com corantes apropriados (coloração simples e diferencial).

OBJETIVOS

1. Fazer a análise macroscópica das colônias
2. Aprender a confeccionar esfregaço bacteriano
3. Aprender a fazer um método de coloração diferencial: método de Gram
4. Aprender os procedimentos básicos para observar em objetiva de imersão
5. Fazer a análise microscópica: aspecto morfológico e tintorial dos microrganismos

MATERIAL FORNECIDO

- Meios com cultivo bacteriano (obtidos na aula anterior)
- Lâmina
- Salina (soro fisiológico)
- Bateria para coloração de Gram
- Óleo de imersão

PROCEDIMENTO

1. Análise macroscópica das colônias. Observar:

1.1.Tamanho (mm):

1.2.Cor (branca, amarela, creme, cinza...):

1.3.Superfície (brilhante, opaca, translúcida):

1.4.Forma :

- | | | |
|--------------|-------------|-------------------|
| • Puntiforme | • irregular | • filamentos
a |
| • circular | • fusiforme | • rizóide |

1.5.Elevação:

- plana
- elevada

- convexa
- monticular

- umbeliforme
- umbelicada

1.6. Margem:

- inteira
- lobulada
- serrilhada
- ondulada
- rizada
- filamentos
a

2. Confecção de esfregaço:

- 2.1. Selecionar uma colônia isolada na placa de cultivo
- 2.2. Identificar a lâmina do lado oposto ao esfregaço
- 2.3. Colocar uma pequena gota de salina na lâmina
- 2.4. Com a alça bacteriológica, flambada em chama de Bico de Bunsen, tocar na colônia escolhida
- 2.5. Fazer um esfregaço fino e homogêneo
- 2.6. Deixar secar à temperatura ambiente
- 2.7. Fixar o esfregaço passando a lâmina 3 vezes na chama (deixar esfriar)
- 2.8. Corar

OBS:

- Os microrganismos devem estar presentes numa concentração de 10^4 - 10^5 /ml para serem observados na objetiva de imersão. Em concentrações menores, raramente podem ser observados, enquanto a cultura pode ser positiva.
- Esfregaços que não forem fixados resultarão em ausência de bactérias.

3. Método de coloração de Gram:**3.1. Cobrir o esfregaço com cristal violeta __ 1**

min Lavar com água corrente

3.2. Cobrir o esfregaço com lugol _____ 1

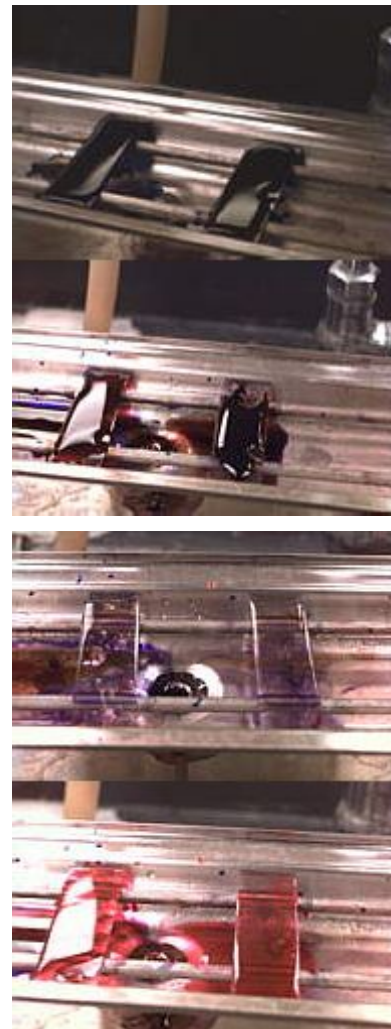
min Lavar com água corrente

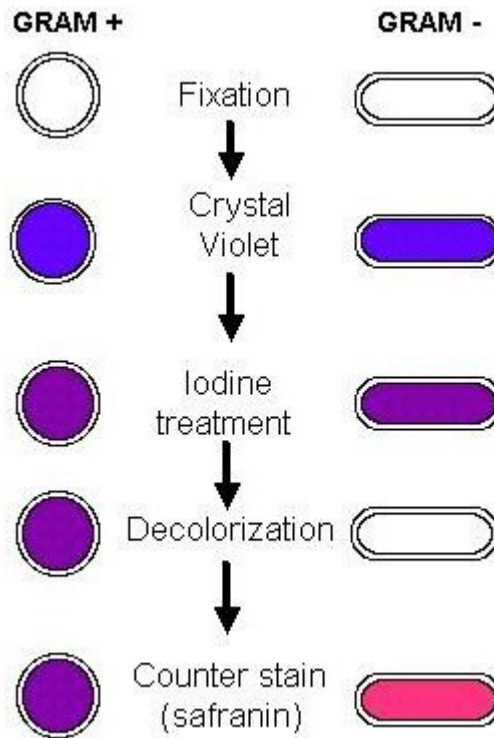
3.3. Cobrir com álcool-acetona (1:1) _____ 10

seg Lavar com água corrente

3.4. Cobrir com Fucsina básica _____ 30 seg

Lavar com água corrente





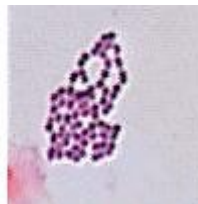
4. Microscopia de imersão:

Após focalizar o esfregaço em objetiva de 10x e 40x, colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e trocar para a objetiva de 100x.

A intensidade de luz deve ser a máxima para a observação dos microrganismos.

5. Exemplos de formas e de arranjos de bactérias Gram positivas e Gram negativas:

5.1. Cocos Gram positivos



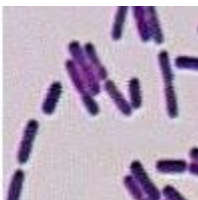
Cachos: normalmente característico de *Staphylococcus* spp.

Cadeia: normalmente característico de *Streptococcus* spp



Tétrade: normalmente característico de *Micrococcus* spp

5.2. Bacilos Gram positivos:



Bacilo grosso: normalmente característico de *Clostridium* spp.

Bacilo delgado:

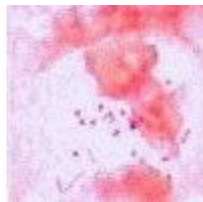


normalmente característico de *Listeria* spp.

Bacilo ramificado: normalmente característico de Actinomycetes e Nocardia



5.3.Cocos Gram negativos



Diplococos: normalmente característico de *Neisseria* spp. (Ex: *N. meningitidis*)

Moraxella spp. e *Acinetobacter* spp. apresentam a morfologia de diplococo. *Acinetobacter* pode ser pleomórfico, e algumas

vezes pode aparecer como coco Gram-positivo.



Cocobacilo: normalmente característico de *Acinetobacter* spp., que pode ser tanto Gram positivo ou Gram negativo, e é freqüentemente Gram variável.

5.4.Bacilo Gram negativo

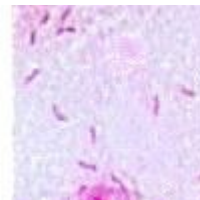


Bacilos curtos (bastonetes): normalmente característico de enterobactérias



Cocobacilo: normalmente característico de *Haemophilus*, que se apresenta também como forma longa e delgada

Curvo: normalmente característico de *Vibrio* spp.; *Campylobacter* spp.



Fuso: normalmente característico de *Fusobacterium* spp.

OBS:

1. Micobacterias se coram pobremente pelo Gram. Algumas aparecem como bacilos Gram-positivos, mas, ao contrário dos difteróides, sem granulações polares;

2. Problema que podem surgir na observação de esfregaços corados pelo método de Gram:
 - Distorção na morfologia por tratamento com antimicrobianos. Ex: em espécimes infectados com bacilos Gram negativos que podem ser observados filamentosos e pelomórficos; em espécimes infectados com Gram positivos, a bactéria pode aparecer Gram lábil.
3. Observar sempre áreas não muito densas do esfregaço.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MICOBACTÉRIAS COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN

INTRODUÇÃO

As micobactérias podem estar presentes em quase todos os materiais clínicos e amostras biológicas. Mas o sucesso em encontrá-las nas preparações microscópicas e cultura depende inicialmente do cuidado tomado na escolha e colheita dos espécimes. Portanto, a escolha do espécime clínico, a colheita, o processamento e a coloração são critérios para estabelecer o diagnóstico de uma doença micobacteriana. Ao contrário de outras micobactérias que causam doença no homem, a *M. leprae* não é isolada.

Metodologias diagnósticas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos, visando uma maior rapidez no isolamento, identificação e determinação de susceptibilidade das micobactérias cultiváveis.

Materiais clínicos para detecção de micobactérias (não *M leprae*):

1. Escarro
 - 3 amostras, pela manhã
 - 5-10 mL

Espectorado ou induzido (com salina hipertônica estéril)

2. Lavado bronco-alveolar ou brônquico (p/ pacientes sem escarro)
 - 5mL

3. Lavado gástrico (p/ pacientes que não colaboram)
 - 3 amostras, pela manhã

Coleta-se o conteúdo gástrico, injeta-se 20-30 mL de salina e coleta-se novamente o conteúdo gástrico (faz-se um pool das 2 coletas)

- Neutralizar com Na_2CO_3 até 4 hs após a coleta

4. Urina
 - 3 amostras, pela manhã
 - 40 mL

Micção natural (seguindo cuidados de antisepsia), cateter ou punção supra-púbica

5. Fluidos outros: LCR, líquido sinovial, líquido pleural, leite
 - 10-15 mL

6. Tecido: (nódulo linfático, pele, biópsia de outros tecidos)
 - 1 g

7. Fezes
 - >1 g

Para pacientes com MAC em AIDS

8. Sangue
 - 5 mL

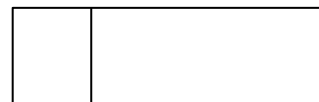
Sistema BACTEC (com agente lisante)

Isolator (c/ saponina): LJ, MB

Para casos de infecção disseminada (MAC em AIDS)

Métodos disponíveis para diagnóstico laboratorial das Micobactérias:**1. Exame Direto:**

- Coloração de Ziehl-Neelsen (pesquisa de BAAR)
- Coloração de Kinyoun (auramina)
- EIA (para pesquisa de anticorpos no líquido)
- PCR
- Probes de ácido nucleico
- Cromatografia gás-líquido

**2. Cultura:**

- Tradicional: em Lowenstein-Jensen (LJ) ou Middlebrook (MB) 7H10 ou 7H11
- Automatizado: sistema radiométrico BACTEC

OBJETIVOS

1. Conhecer os materiais clínicos e os procedimentos de colheita para o diagnóstico
2. Conhecer os procedimentos utilizados em laboratórios de referência para o diagnóstico das micobacterioses
3. Conhecer os procedimentos utilizados no isolamento e identificação
4. Conhecer os métodos utilizados na determinação da susceptibilidade
5. Aprender o processamento e cuidados necessários à confecção do esfregaço e coloração de Ziehl-Neelsen
6. Observar microscopicamente o *M. tuberculosis* e o *M. leprae*

MATERIAL FORNECIDO

- Espécime clínico: escarro
- Lâmina nova
- Pinça
- Bateria de Ziehl-Neelsen
- Chumaço de algodão
- Palito de madeira

PROCEDIMENTO**1. Confecção do esfregaço:**

- 1.1. Com auxílio de haste de madeira, selecionar uma porção adequada do escarro
- 1.2. Confeccionar o esfregaço, utilizando 2/3 da lâmina, conforme o esquema ou colocar esfregaço de 2 cm de diâmetro a partir de material concentrado
- 1.3. Deixar a lâmina secar à TA, ou em chapa aquecida à 90°C (2 hs - ON)

2. Coloração de Ziehl - Neelsen:**2.1.**

Fixar as lâminas (caso não tenham sido fixadas na chapa)



2.2.

Cobrir com Carbol Fucsina

- manter a lâmina toda coberta de corante durante todo o processo de coloração

**2.3.**

Aquecer a lâmina com cuidado, com auxílio do bico de Bunsen ou de um chumaço de algodão, até emissão de vapores.

- Manter aquecimento por 3-5 min, com calor intermitente (passando o chumaço de algodão com fogo sob a lâmina)

Cuidado: superaquecimento destrói o esfregaço e pode quebrar a lâmina.

**2.4.**

Lavar a lâmina com água.

**2.5.**

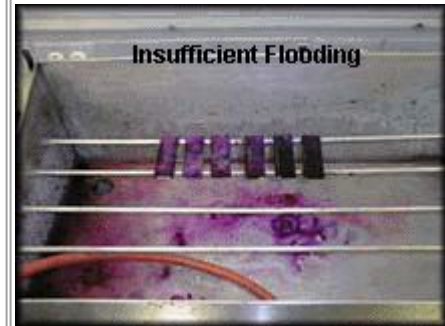
Cobrir a lamina com álcool-ácido 3% e deixar descorar por 30 seg-1min.

- Trocar sempre o álcool-ácido até que nenhum



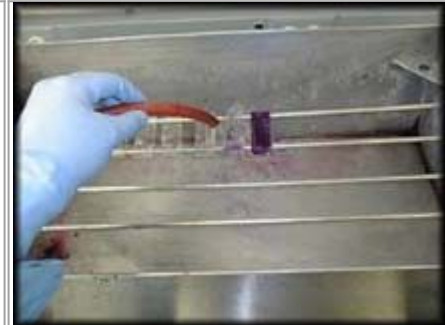
corante seja visualizado a olho nu.

Exemplos de descoloração insuficiente e suficiente nas figuras à direita.



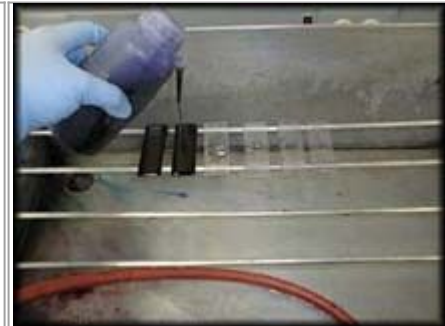
2.6.

Lavar com água e escorrer o excesso da lâmina



2.7.

Cobrir a lamina com o contracorante Azul de Metileno e deixar durante 1 min.

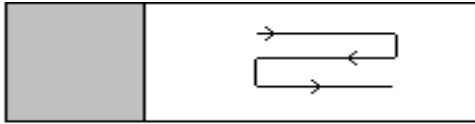


2.8.

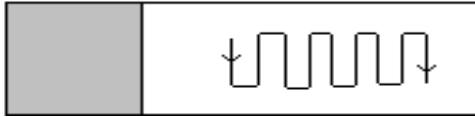
Lavar com água.



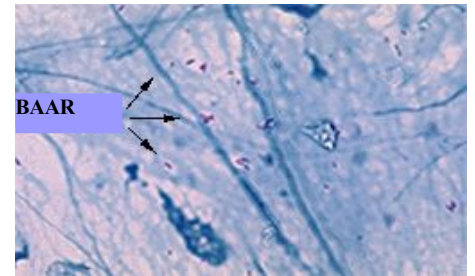
Leitura e interpretação



Seguir um dos esquemas ao lado para observação dos campos.



Observar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), que tomam a cor rosa, contra o fundo azul.



Resultados possíveis (tuberculose):

3.1. Negativo: nenhum BAAR em 100 campos microscópicos observados

3.2. Positivo:

- + Menos de 1 BAAR por campo em 100 campos microscópicos observados
- ++ De 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos microscópicos observados
- +++ Mais de 10 BAAR por campo em 20 campos microscópicos observados

Determinação do Índice Bacilar- IB (hanseníase):

IB= 0 não há bacilos em nenhum dos 100 campos

examinados IB= 1+ 1-10 bacilos em 100 campos examinados

IB= 2+ 1-10 bacilos em cada 10 campos examinados (11-99 bacilos em 100 campos)

IB= 3+ 1-10 bacilos, em média, em cada campo examinado

IB= 4+ 10-100 bacilos, em média, em cada campo

examinado IB= 5+ 100-1000 bacilos, em média, em cada campo examinado

IB= 6+ mais de 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado

Preparo de Soluções para Coloração de Ziehl-Neelsen

ÁLCOOL ÁCIDO 3%

- Etanol 95%
- HCl concentrado

Preparo:

1. Medir 970 mL de etanol 95% em proveta.
2. Colocar em um frasco de 1 litro.
3. Adicionar 30 mL de HCl conc cuidadosamente sobre o álcool.
4. Misturar suavemente.
5. Identificar o frasco com o nome do reagente, data de preparo e expiração, nome da pessoa que preparou.
6. Estocar à TA por 3 meses.

AZUL DE METILENO

- Azul de Metileno
- Etanol absoluto

- KOH
- H₂O deionizada

1. Pesar 9 g of Azul de metileno e colocar em Erlenmeyer de 4000 mL.
2. Adicionar 900 mL de álcool absoluto.
3. Pesar 0,3 g de KOH e adicionar à solução acima.
4. Adicionar 3000 mL de H₂O deionizada.
5. Agitar com barra magnética em um agitador magnético.
6. Deixar a solução dissolver por 2 a 3 dias.
7. Filtrar depois de dissolvido.
8. Identificar o frasco com o nome do reagente, data de preparo e expiração, nome da pessoa que preparou.
9. Estocar à TA por até 1 ano.

CARBOL FUCSINA

Fucsina Básica 10%

- Fucsina Básica em pó
- Etanol absoluto
- Fenol liquefeito

1. Pesar 10g de fucsina básica e colocar em frasco de 100 mL
2. Adicionar 100 mL de etanol e misturar
3. Dissolver sob agitação magnética durante 3-4 dias
4. Após dissolvida, estocar a solução à TA por no máximo 6 meses
5. Identificar o frasco com o nome do reagente, data de preparo e expiração, nome da pessoa que preparou
6. Estocar à TA por até 1 ano

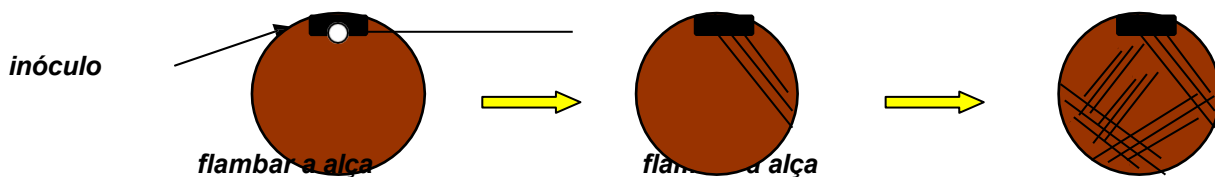
Carbol Fucsina

1. Colocar 100 mL da solução de Fucsina Básica em Erlenmeyer de 1000 mL
2. Adicionar 50 mL de fenol liquefeito
3. Adicionar 850 mL de H₂O deionizada
4. Homogeneizar
5. Filtrar a solução e rotular
6. Carbol Fucsina pode ser estocada à TA por até 3 meses

PROCEDIMENTO PARA CONTROLE MICROBIOLOGICO

1. Semeadura de amostra clínica:

- 1.1. Homogeneizar a amostra e pegar uma alíquota com auxílio da alça bacteriológica;
- 1.2. Semear na placa de ágar EMB ou MC, pela técnica de esgotamento e flambando a alça após a primeira semeadura e antes das demais direções, conforme esquema:



- 1.3. Semear nova alíquota na placa de Ágar SS, conforme esquema acima, mas sem flambar a alça entre cada direção de semeadura;

- 1.4. Incubar em estufa a 37°C, por 24-48 horas

2. Leitura e interpretação (de acordo com a composição do meio de cultura):

- 2.1. Verificar:
 - Aspecto macroscópico das colônias
 - Ágar EMB ou McConkey: fermentação da lactose
 - Ágar SS: fermentação da lactose
produção de H₂S



Ágar McConkey

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DOS ESTAFILOCOCOS**INTRODUÇÃO**

Os estafilococos são bactérias encontradas em ambientes e como microbiota de homem e de animais. Este gênero compreende espécies significativamente patogênicas para o homem, causando um amplo espectro de doenças que variam de infecções cutâneas superficiais a doenças sistêmicas letais, sendo inclusive responsável por muitas infecções adquiridas no ambiente hospitalar. Estão entre as mais resistentes das bactérias patogênicas e são difíceis de serem eliminadas da pele e de membranas mucosas humanas.

OBJETIVOS

1. Colher material clínico para estudo de portadores de *S. aureus*
2. Conhecer a importância do uso de meios de transporte, de meios de crescimento enriquecidos, seletivos e indicadores.
3. Reconhecer o crescimento de estafilococos, através da análise macro e microscópica das colônias.
4. Saber o fundamento e realizar a técnica de coagulase para determinar a espécie *Staphylococcus aureus*

MATERIAL FORNECIDO

- Zaragatoa
- Salina
- Ágar Sangue
- Ágar manitol hipertônico
- Plasma 1:2 e 1:5
- Bateria de Gram

PROCEDIMENTO**1. Colheita de material clínico:**

- 1.1. Umedecer a zaragatoa na solução salina e remover o excesso contra as paredes do tubo
- 1.2. Inserir nas fossas nasais, até a altura do septo nasal e fazer movimentos rotatórios (Fazer o mesmo procedimento em ambos os lados)

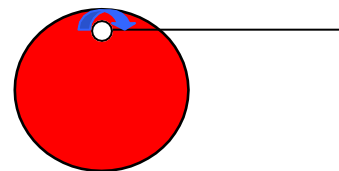
2. Transporte do material clínico:

Utilizar meios que preservem a viabilidade do microrganismo, sem permitir a sua multiplicação. Ex: Meio de transporte Stuart.

OBS.: Este procedimento deverá ser realizado sempre que demandar mais de 30 minutos entre a colheita do material clínico e o encaminhamento ao laboratório.

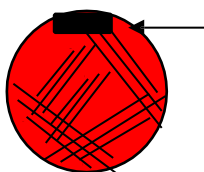
3. Semeadura:

- 3.1. Semear o inóculo bacteriano "rolando" a zaragatoa na placa de Ágar Sangue, conforme esquema:



- 3.2. Semear em toda a extensão do ágar manitol hipertônico

- 3.3. Com a alça bacteriológica flambada e resfriada, distribuir o inóculo bacteriano na placa de Ágar Sangue, conforme o esquema:



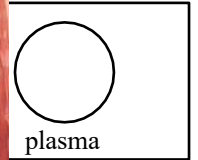
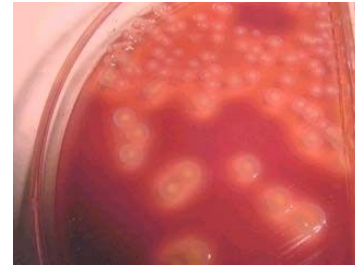
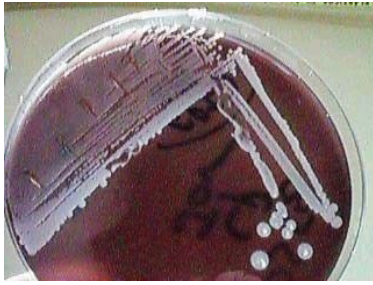
Inóculo

- 3.4. Incubar os meios de crescimento em estufa a 37°C por 24- 48 horas.

4. Análise macroscópica das colônias:

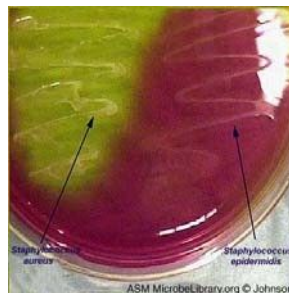
4.1. Ágar Sangue

- tamanho: 1-4 mm
- cor: branca a amarelo ouro e acinzentada
- ligeiramente elevada
- com ou sem hemólise



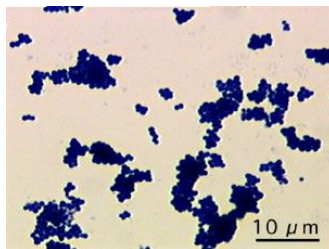
4.2. Ágar Manitol hipertônico

- crescimento: + ou -
- manitase: + ou -



5. Análise microscópica:

De colônia isolada, macroscopicamente sugestiva de *Staphylococcus*, realizar a confecção de esfregaço e coloração de Gram, de acordo com a metodologia descrita em roteiro anterior.



6. Teste de coagulase:

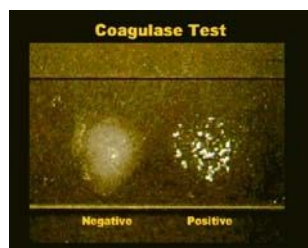
Realizar a partir de colônias compatíveis com *Staphylococcus* e confirmadas na microscopia.

6.1. Coagulase em lâmina:

- 6.1.1. Em uma lâmina colocar 1 gota de solução salina e 1 gota de plasma (1:2), conforme esquema
- 6.1.2. Com a alça bacteriológica estéril, pegar umas 3 colônias da bactéria e homogeneizar na salina. Fazer o mesmo para o plasma.
- 6.1.3. Observar se ocorrerá aglutinação imediata ou nos próximos 20 segundos, que deverá ocorrer só no plasma

Resultados possíveis:

1. Negativo: confirmar em tubo
2. Positivo: sugere *S. aureus*
3. Colônia rugosa: fazer em tubo



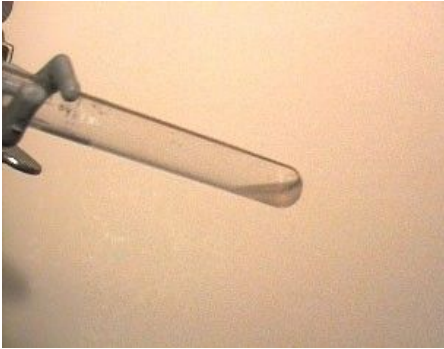
6.2. Coagulase em tubo:

- 6.2.1. Com auxílio da alça bacteriológica, inocular 2-3 colônias de estafilococo teste em um tubo contendo plasma (1:5).

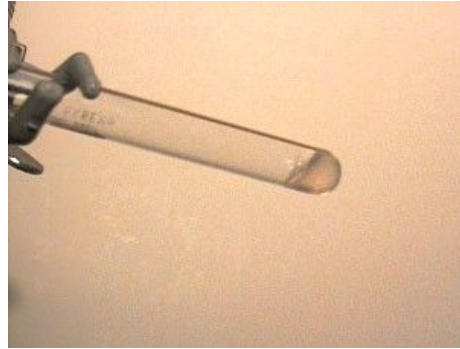
6.2.2. Repetir o procedimento acima, para uma cepa padrão de *S.aureus* (controle)

6.2.3. Incubar a 37°C e proceder a leitura em diferentes tempos (enquanto a coagulação não for observada): 1h, 2hs, 4hs, 6hs e 24hs.

Resultados possíveis:



***Staphylococcus* coagulase negativo**



***Staphylococcus* coagulase positivo**

7. Teste de DNase:

Para cepas com reações fracas e duvidosa de coagulase em tubo, ou para os raros isolados de *S. aureus* que são coagulase negativos.

- 7.1. Fazer dois inóculos denso da cepa de *Staphylococcus*, separados a uma distância de 2 cm, em placa de ágar DNA;
- 7.2. Incubar 37°, 24 hs;
- 7.3. Cobrir o meio com HCL 1N e fazer a leitura, conforme ilustração abaixo.



DNase+



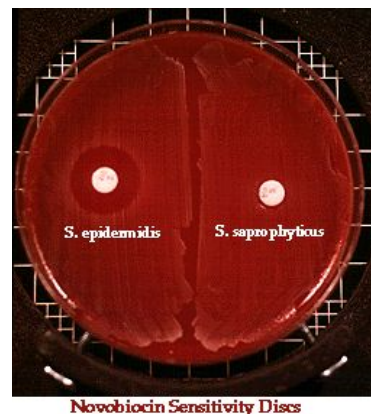
DNase-

Como o *S. aureus* apresentam a termonuclease (DNase termorresistente), este teste deve ser realizado a partir de caldo da cepa suspeita, fervido durante 15 min, e colocado em orifício na placa do ágar DNA. A leitura se faz como acima.

8. Teste de Novobiocina:

Para cepas coagulase negativa, principalmente se isoladas a partir de urina.

- 8.1. Fazer uma suspensão da bactéria em solução salina (turvação correspondente à escala 0,5 de Mac Farland) e distribuir homogeneamente em uma placa com ágar Müller Hinton;
- 8.2. Colocar o disco de Novobiocina;
- 8.3. Incubar a placa a 37°C, por 24 hs.

**9. Tabelas para diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* e das espécies mais comumente isoladas de *Staphylococcus*:****Diferenciação entre *Staphylococcus* e *Micrococcus***

	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
MÉTODO		
Produção de ácido a partir de glicose em anaerobiose	-	+
Lisostafina	R	S
Produção de ácido a partir de glicose em anaerobiose e em presença de 0,4 µg de eritromicina	-	+
Furazolidona (discos de 100 µg)	R	S
Prova de oxidase modificada	+	-
Bacitracina (discos de 0,04 U)	S	R

Diferenciação resumida de espécies de *Staphylococcus*

CARACTERÍSTICAS	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Cor da colônia	branca/amarelo ouro	branca	branco/amarelo
Hemólise em ágar sangue	+	+/-	-
Coagulase	+	-	-
Fermentação do manitol	+	-	+/-
DNAse termorresistente	+	-	-
Resistência à novobiocina	-	-	+

10. Teste de Catalase:

Para diferenciar o gênero *Staphylococcus* (positivo) de *Streptococcus* (negativo)

Teste em lâmina:

- 10.1. Pegar com a colônia suspeita e colocar em uma lâmina limpa;
- 10.2. Pingar 1 gota de H₂O₂ 3%

Teste em placa:

- 10.3. Pingar diretamente sobre a colônia suspeita 1 gota de H₂O₂ 3%

OBS: não realizar diretamente sobre a colônia se o meio de cultura tiver sangue

Resultado:

(+) *Staphylococcus*: formação imediata de bolhas de O₂ produzidas pela ação da catalase

(–) *Streptococcus*: não ocorre emissão de bolhas de O₂

*Cat (-)**Cat (+)***OBS:**

1. É necessário recorrer a esquemas mais completos para diferenciação das espécies de estafilococos;
2. Existem sistemas comerciais para identificação de estafilococos coagulase negativos. Ex:
 - 2.1. API Staph-IDENT (bioMérieux-Vitek, Inc), que utiliza 10 provas bioquímicas miniaturizadas;
 - 2.2. API STAPH (bioMérieux-Vitek, Inc), para identificação de micrococos e estafilococos, com 19 provas distintas.
3. Outros métodos para identificação de *S. aureus*:
 - 3.1. Aglutinação em látex (partículas revestidas com anticorpo anti-proteína A);
 - 3.2. Detecção da enzima endo- β -n-Acetil glicosaminidase (SaG) por ensaio imuno-enzimático.

UNIG CAMPUS V

Roteiro de Aula Prática

Prof.: Juliano G. Barreto

Identificação de Enterobactérias – Rugai com lisina**Princípio de técnica**

As colônias a identificar são semeadas por picada em profundidade e estriamento de superfície em um tubo contendo o meio inclinado, seguido de incubação a 35°C por 18-24h.

Após a incubação, é realizada a leitura do meio de Rugai e do meio lisina-motilidade, e os dados são pesquisados em tabelas apropriadas.

Procedimento Técnico

a- Deixar que o meio de cultura e demais materiais atinjam temperatura ambiente antes de serem utilizados;

b- Se as colônias a analisar forem lactose negativa verificar se estas são oxidase negativas, pois o meio não pode ser usado na identificação de bactérias oxidase positivas;

c- Usando a agulha bacteriológica flambada, encostar na superfície de uma colônia e inocular através de uma picada central que atinja a porção inferior do meio lisina-motilidade, cuidando para não entortar a ponta da agulha. Ao puxar a agulha em direção à superfície, cuidar para que esta percorra o mesmo caminho e ao atingindo a superfície fazer o estriamento;

d- Incubar em estufa bacteriológica a 35°C por 18-24h com a tampa frouxa e ler os resultados:

Meio de Rugai (fase localizada acima da cêra de carnaúba)

- Desaminação do L-Triptofano (TRI): prova positiva quando há desenvolvimento de coloração verde garrafa no ápice do tubo e a prova negativa se caracteriza pela manutenção da cor original do meio ou cor amarelada;

- Fermentação da glicose (GLI): o surgimento de cor amarela na porção inferior de meio, caracteriza prova positiva, do contrário, o meio mantém-se inalterado; esta prova deve ser obrigatoriamente positiva para todas as enterobactérias, devendo-se atentar para o fato de que, nos casos de bactérias que produzem H₂S ou hidrolisam a uréia, a cor amarela é mascarada;

- Produção de gás a partir da glicose (GAS): caso a bactéria em estudo produza gás a partir da glicose, irão se formar bolhas no interior do meio, podendo em alguns casos o meio pode chegar a se partir e sofrer deslocamento;

- Produção de gás sulfídrico (H₂S): a produção de gás sulfídrico é evidenciada pelo surgimento de coloração negra com intensidade variável na porção inferior de meio;

- Hidrólise da uréia: considera-se a prova positiva quando há a formação de uma coloração azulada na porção inferior de meio.

Meio lisina-motilidade (fase localizada abaixo da cêra de carnaúba)

- Descarboxilação da lisina (LIS): inicialmente o meio ficará amarelo indicando que a bactéria é viável, e no caso de haver a descarboxilação da lisina, o meio volta à cor púrpura original, do contrário, para prova negativa, o meio mantém-se amarelo.

- Motilidade (MOT): caso o crescimento bacteriano fique restrito à linha de picada, considera-se a motilidade negativa, do contrário, para a motilidade positiva há um crescimento difuso com turvação parcial ou completa do meio;

- Indol (IND)

Adicionar 1-2 gotas do reativo de indol na parte interna da tampa do tubo e aguardar cerca de dois minutos, o surgimento de uma cor vermelha caracteriza a prova positiva.



MBiolog Diagnósticos Ltda. • PABX: (31) 3394-9005
e-mail: vendas@mbiolog.com.br

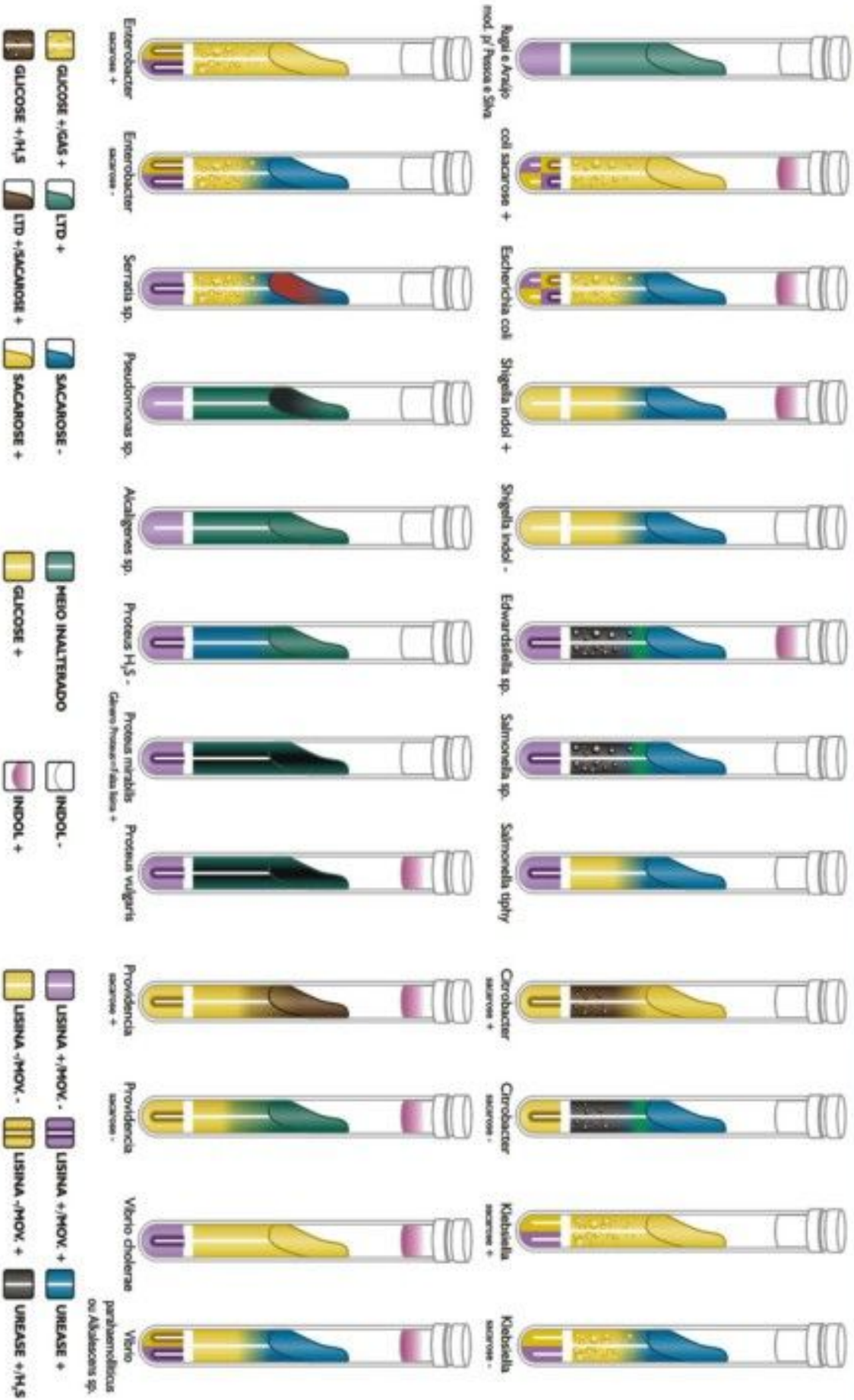


Tabela ilustrativa para orientação na identificação presumida de microrganismos. A coloração do meio pode apresentar pequenas variações conforme o tipo bacteriano.

Referências Bibliográficas:

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

FORBES, B. A.; SAHIM, D. F.; WEISSFELD, A. S. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology.* 14th ed. St. Louis: Elsevier, 2020.

ISENBERG, H. D. (ed.). *Clinical microbiology procedures handbook.* 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. 3 v.

JAMES, G.; CAPPUCCINO, J.; SHERMAN, N. *Microbiologia: laboratório.* 9. ed. Porto Alegre: AMGH, 2021.

KONEMAN, E. W. et al. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2017.

MACFADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

QUINN, P. J. et al. *Clinical veterinary microbiology.* 2nd ed. London: Wolfe Publishing, 2011.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.* 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

Roteiro prático para Análises Microbiológicas – Identificação bacteriana

Prof. Juliano Gomes Barreto

Doutorando em Ciências Farmacêuticas

MSC em Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente

Especialista em Análises Clínicas

Universidade Iguazu – Campus V Itaperuna

Curso de Farmácia