

Procedimento Operacional Padrão – POP

Práticas Interdisciplinares de Microbiologia

Laboratório Multidisciplinar 1

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

**CONTROLE MICROBIANO E MICROBIOTA DA
PELE**

POP - 001

1- Executantes

Os colaboradores, acadêmicos e professores das FIPGuanambi.

2- Objetivo

Verificar a presença microrganismos no ambiente.

Observar a eficácia da lavagem com água e sabão e da ação de agentes antissépticos na redução do número de microrganismos presentes nas mãos, assim como a ação de desinfetantes para a redução e o controle de microrganismos presentes em superfícies.

Observar os aspectos morfológicos das bactérias e diferenciar bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.

3- Responsabilidade

- Técnicos do laboratório: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Alunos: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Professor: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Responsável técnico: supervisão, orientação e treinamento dos envolvidos quanto a rotina estabelecida neste procedimento.

4- Amostras

Placas contendo meios de cultura (Ágar Simples e Ágar Sabouraud); Swabs; Tubos com solução salina estéril; Lâminas de microscopia; Alça de platina; Soluções antissépticas: álcool iodado e antisséptico

Elaboração

Josiane dos Santos Amorim

comercial; Barra de sabão de côco; Toalhas de papel estéreis.

5- Equipamentos

Microscópio ótico e incubadora.

6- Procedimentos

Procedimento 1

- Cada grupo de alunos receberá três placas com meios de cultura, duas com meio Ágar Simples e uma com meio Ágar Sabouraud;
- Identificar cada uma das placas, anotando nome, curso e data;
- Numerar as placas de Ágar Simples (AS) com os números 1 e 2; numerar a placa de Ágar Sabouraud (SB) com o número 3;
- Com a placa nº1, escolher uma das sugestões a seguir (cada grupo define uma opção e avisa imediatamente à turma para que outros grupos não façam o mesmo procedimento), desta forma, na leitura dos resultados da prática teremos um material mais rico para discutir:

a) Umedecer o swab com solução salina e passá-lo sobre a superfície da bancada; ou na sola do sapato; ou sobre o celular; ou outra superfície de escolha (cada grupo deverá escolher uma superfície diferente). Em seguida, abrir a placa com cuidado, passar o swab com o material colhido sobre o meio de cultura (semeadura); fechar a placa.

b) Umedecer um swab com solução salina e passá-lo sobre a pele, ouvido, embaixo das unhas ou qualquer outra região do corpo, em seguida, abrir a placa com cuidado, passar o swab sobre o meio de cultura; fechar a placa.

c) Depositar alguns fios de cabelo sobre o meio de cultura; fechar a placa.

- Com as placas de número 2 e 3, levá-las para um local fora do ambiente do laboratório de Microbiologia e deixá-las expostas ao ar durante 20 minutos; após este tempo, fechar as placas, anotar o lugar em que foram expostas e retorná-las ao Laboratório. As placas 1 e 2 serão incubadas a 36°C, por aproximadamente 24hs e a placa 3 será

incubada à temperatura ambiente por pelo menos 4 dias.

- Leitura e Interpretação dos resultados: Observar a presença de diferentes tipos de colônias na superfície dos meios de cultura; Observar as diferenças em relação aos tamanhos, aspectos e cores, etc.

Procedimento 2

- Tomar uma placa de ágar simples e dividi-la na parte externa do fundo em 3 setores, identificando-os com um marcador em setores I, II e III. Identificar a placa também com seus dados, tais como, curso, turma e data.

- Sem lavar as mãos, abrir a placa próximo à chama do Bico de Bunsen e tocar o dedo indicador no meio de cultura na área correspondente ao setor I. Fechar imediatamente a placa, deixando-a perto da chama do Bico de Bunsen;

- Lavar as mãos demoradamente (3 a 5 minutos) com água e sabão neutro. Enxugar as mãos com toalha estéril, abrir a placa próximo à chama do Bico de Bunsen e tocar com o mesmo dedo indicador no meio de cultura na área correspondente ao setor II. Fechar imediatamente a placa, deixando-a perto da chama do Bico de Bunsen;

- Passar a solução antisséptica nas mãos (álcool iodado ou um antisséptico comercial), enxugar em toalha estéril, abrir a placa próximo à chama do Bico de Bunsen e tocar com o mesmo dedo indicador no meio de cultura na área correspondente ao setor III. Fechar imediatamente a placa.

- Incubar a placa a 37°C.

- Leitura e Interpretação dos resultados: Retirar as placas de ágar simples da estufa;

Observar o crescimento bacteriano nas diferentes áreas da placa, caracterizando os tipos morfológicos das colônias e o número de colônias em cada um dos setores marcados. O crescimento na área I qualifica a microbiota transitória ou flutuante, principalmente. O crescimento na área II qualifica a microbiota residente ou permanente.

O crescimento na área III qualifica a microbiota resistente ao antisséptico usado.

Procedimento 3

- Marcar a lâmina, delimitando a área do esfregaço e marcar com lápis dermatográfico o lado da lâmina oposto ao que realizaremos o esfregaço;
- Fazer o esfregaço: com alça de platina flambada e resfriada, retirar pequena porção de salina e espalhar na lâmina;
- Flambar novamente a alça e após esfriá-la, retirar uma porção da colônia da placa, colocando-a sobre a salina em cima da lâmina. Distribuí-la em movimentos circulares, a fim de se obter uma camada delgada e bem dispersa na área delimitada;
- Secar ao ar ou perto da chama sem aquecer a lâmina demasiadamente. A secagem ao ar evita a formação de aerossóis que acontecem quando fixamos a lâmina antes que a mesma esteja seca. Os aerossóis constituem fonte de contaminação, pois nestes estão contidos os microrganismos presentes no material.
- Após seca, a lâmina deverá ser fixada, antes de iniciarmos o processo de coloração. A fixação evita que as células dos microrganismos sejam lavadas e perdidas durante o processo de coloração. Além disto, a fixação permite a aderência das células à lâmina, matando os microrganismos através da coagulação de seus protoplasmas, preservando suas estruturas na forma e posição originais. O calor é o método de fixação frequentemente utilizado. Para fixarmos, passamos a lâmina com o esfregaço voltado para cima, por três vezes através da chama. Evitar o superaquecimento testando a cada passada na chama a temperatura da lâmina no dorso da mão.

a) Cobrir o esfregaço com SOLUÇÃO DE CRISTAL VIOLETA e deixar atuar por 1 minuto.

O Cristal violeta tem a função de corante primário. Este é um corante básico que possui afinidade pelo citoplasma devido a carga elétrica negativa oriunda principalmente dos radicais fosfatos dos ácidos

nucléicos. Num primeiro momento, todas as bactérias (G+ e G-) absorvem igualmente o cristal violeta.

b) Lavar o esfregaço com ÁGUA, para retirar o excesso do primeiro corante. Cobrir o esfregaço com LUGOL e deixar atuar por 1 minuto. O Lugol (solução de iodo-iodeto de potássio) tem a função de mordente. O mordente tem a finalidade de aumentar a afinidade do primeiro corante pela célula, permitindo que ela se core mais intensamente. O lugol reage com o cristal violeta formando o complexo iodo-cristal violeta (CV-I), que se fixa e cora a célula mais intensamente.

c) Lavar novamente a lâmina em água e descorá-la imediatamente com ÁLCOOL. (CUIDADO! Não descorar por muito tempo! Somente o tempo necessário para que o excesso do corante seja retirado!). O Álcool Etílico tem a função de agente descorante e diferenciador. Durante sua utilização algumas células se descoram mais facilmente que outras. Este comportamento distinto de descoloração é o que diferencia as bactérias. As BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS não se descoram facilmente pelo tratamento com o álcool; isto se explica pelo fato destas possuírem uma parede celular espessa (várias camadas de peptidoglicano), além de outros componentes não são solúveis em álcool, como ácidos teicóicos, proteínas, polissacárides, etc. Acredita-se que o álcool reduza a permeabilidade da parede, dificultando a saída do complexo CV-I do citoplasma celular. A bactéria Gram-positiva permanece então com a mesma coloração

(roxo ou azul). As BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS são facilmente descoradas pelo tratamento com álcool. Elas possuem uma membrana externa rica em lípidos (lipoproteína, fosfolípidos e lipídio "A" que participa do LPS). O álcool solubiliza (dissolve) estes lipídeos ou extrai a membrana externa, o que contribui para um aumento da permeabilidade da parede. As bactérias gram-negativas também possuem uma camada delgada de peptidoglicano que não é suficiente para impedir a passagem do solvente (menor entrecruzamento das camadas). Desta forma, o álcool penetra e remove o complexo CV-I do citoplasma celular, descorando a célula.

d) Lavar o esfregaço imediatamente com água e cobri-lo com solução de fucsina por 1 minuto. A fucsina tem função de corante secundário ou contra corante. As bactérias anteriormente descoradas pelo álcool são contra coradas pela fucsina (coram-se em rosa ou vermelho). As células que não foram anteriormente descoradas pelo álcool (gram-positivas) não absorvem a fucsina, permanecendo com a cor do corante primário (cristal violeta) até o final da coloração.

e) Lavar a lâmina em água e secar ao ar. Examinar com objetiva de imersão.

- Leitura e Interpretação dos resultados: Microrganismos Gram-positivo: corados em roxo; Microrganismos Gram-negativo: corados em vermelho.

7- Referências

RIBEIRO, Mariângela. Microbiologia Prática 2011 Ed Atheneu.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, Michael A. Microbiologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 873p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 888p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 964p.

Laboratório Multidisciplinar 1

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
STAPHYLOCOCCUS**

POP – 02

1- Executantes

Os colaboradores, acadêmicos e professores das FIPGuanambi.

2- Objetivo

Entender a importância do meio seletivo e diferenciar o crescimento de microrganismos do gênero *Staphylococcus*.

3- Responsabilidade

- Técnicos do laboratório: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Alunos: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Professor: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Responsável técnico: supervisão, orientação e treinamento dos envolvidos quanto a rotina estabelecida neste procedimento.

4- Amostras

01 placa de Ágar Hipertônico Manitol ou Ágar Manitol Salgado; Tubos com plasma diluído 1:10; Peróxido de hidrogênio (água oxigenada); 01 tubo de Caldo Tioglicolato; Bateria de Gram; 05 Swabs estéreis; Lâminas para microscopia.

5- Equipamentos

Microscópio ótico e incubadora.

Elaboração

Josiane dos Santos Amorim

6- Procedimentos

- Coletar material da mucosa de ambas as narinas com o swab estéril e semeá-lo na placa de ágar Hipertônico Manitol, por esgotamento.
- Coletar material da garganta com outro swab estéril e introduzi-lo no Caldo Tioglicolato.
- Identificar o tubo e a placa e incubá-los a 37°C por 24 horas.
- Leitura e interpretação dos resultados: Retirar o tubo de Caldo Tioglicolato da estufa e observar o crescimento no tioglicolato (turvação do meio e/ou presença de grumos na camada aeróbia/crescimento em estalactites); preparar esfregaço a partir de Caldo Tioglicolato proceder à coloração de Gram. Observar arranjo, morfologia celular e aspecto tintorial em microscopia óptica com objetiva de imersão (aumento 1000x); Retirar a placa de Ágar Hipertônico Manitol da estufa e observar o crescimento; Diferenciar as colônias quanto a pigmentação: cor branca ou amarela;
- Observar se houve modificação da cor do meio de cultura, de róseo para amarelo, devido a viragem do indicador de pH (vermelho de fenol), resultante da fermentação do manitol. Quando não há fermentação do manitol o meio permanece inalterado (manitol negativo);
- Teste da catalase: retirar uma colônia da placa de manitol, colocá-la na lâmina e pingar água oxigenada. Observar a formação de bolhas, devido a reação de degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, pela enzima catalase, produzida pelos estafilococos.
- Coloração de GRAM: Colocar uma alça de salina estéril numa lâmina limpa e fazer um esfregaço fino com uma colônia suspeita, a partir da placa de manitol (você poderá fazer também de outras colônias que cresceram no meio). Corar pelo método de Gram e observar a morfologia celular e aspecto tintorial em microscopia óptica com objetiva de imersão (aumento 1000x).

Caracterização fisiológica (provas de patogenicidade):

Comprovada a morfologia característica do gênero *Staphylococcus*, prosseguimos na determinação das características fisiológicas

inerentes à espécie através das provas de patogenicidade:

- Prova de coagulase: havendo colônias manitol positivas, transfira algumas delas para um tubo com plasma de coelho citratado diluído 1:10, fazendo uma suspensão homogênea. Incubar a 37°C por 3 horas. A leitura feita com mais de 3 horas de incubação pode dar resultado falso-negativo. Para evitar tal causa de erro, os tubos, após este período, serão mantidos a 4°C.

7- Referências

RIBEIRO, Mariângela. Microbiologia Prática 2011 Ed Atheneu.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, Michael A. Microbiologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 873p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 888p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 964p.

Laboratório Multidisciplinar 1

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

ANTIBIOGRAMA

POP – 03

1- Executantes

Os colaboradores, acadêmicos e professores das FIPGuanambi.

2- Objetivo

Observar através do antibiograma se a bactéria é resistente, sensível ou se possui sensibilidade intermediária à determinado antibiótico pela medição do halo de inibição.

3- Responsabilidade

- Técnicos do laboratório: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Alunos: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Professor: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Responsável técnico: supervisão, orientação e treinamento dos envolvidos quanto a rotina estabelecida neste procedimento.

4- Amostras

Culturas bacterianas (*Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*); Salina estéril para diluição; Placas de ágar Mueller Hinton; Discos de antibióticos (AMO, AMC, TET e CIP); Swabs; Pinça esterilizada e Escala Mac Farland.

5- Equipamentos

Incubadora.

Elaboração	Josiane dos Santos Amorim
-------------------	---------------------------

6- Procedimentos

- Agitar o tubo contendo cultura em meio líquido e realizar diluições para que a concentração final seja próxima à escala 0,5 de Mac Farland (~ 108 ufc).
- Umedecer o swab na cultura, pressionar sobre as paredes para retirar o excesso.
- Semear sobre toda a placa uniformemente.
- Colocar os discos de antibióticos com o auxílio da pinça em pontos equidistantes.
- Incubar por 24 a 48 h a 37°C em aerobiose e fazer as leituras.
- Leitura e Interpretação dos resultados: Verificar a presença ou ausência dos halos de inibição ao redor dos discos, medir o diâmetro em mm e anotar os resultados.

7- Referências

RIBEIRO, Mariângela. Microbiologia Prática 2011 Ed Atheneu.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, Michael A. Microbiologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 873p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 888p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 964p.

Laboratório Multidisciplinar 1

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

UROCULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

POP – 04

1- Executantes

Os colaboradores, acadêmicos e professores das FIPGuanambi.

2- Objetivo

Analisar as distintas reações bioquímicas e sua utilização como método diagnóstico para enterobactérias.

3- Responsabilidade

- Técnicos do laboratório: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Alunos: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Professor: execução das atividades conforme estabelecidas neste documento;
- Responsável técnico: supervisão, orientação e treinamento dos envolvidos quanto a rotina estabelecida neste procedimento.

4- Amostras

01 placa de Ágar MacConkey, Ágar Sangue, Ágar CLED semeada com representante de bactéria entérica; Tubos com meio de cultura TSI; Bateria de testes bioquímicos para enterobactérias; Bateria de Gram; Lâminas para microscopia.

5- Equipamentos

Microscópio ótico e incubadora.

Elaboração	Josiane dos Santos Amorim
-------------------	---------------------------

6- Procedimentos

- Identificar as colônias lactose positiva e lactose negativa, de acordo com o aspecto que apresentam no meio seletivo indicador - MacConkey.
- Escolher uma cultura das placas de meio seletivo-indicador (Lac + ou Lac -) para a semeadura.
- Inocular a amostra escolhida em um tubo de ensaio contendo o meio TSI.
- Inocular também a série de testes para identificação do gênero bacteriano em estudo, segundo suas características bioquímicas.
- Identificar e incubar o material a 37°C por 24 horas.
- Leitura e interpretação dos resultados: Interpretar o TSI conforme Quadro e identificar o gênero bacteriano segundo os quadros de identificação.

7- Referências

- RIBEIRO, Mariângela. Microbiologia Prática 2011 Ed Atheneu.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, Michael A. Microbiologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 873p.
- TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 888p.
- TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 964p.