



José Luciano Bezerra Moreira  
Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Cristiane Cunha Frota

# Visualização bacteriana e colorações



# **Visualização bacteriana e colorações**

**Presidente da República**

Dilma Vana Rousseff

**Ministro da Educação**

Aloízio Mercadante

**Universidade Federal do Ceará - UFC**

**Reitor**

Henry de Holanda Campos

**Vice-Reitor**

Custódio Luís Silva de Almeida

**Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação**

Prof. Gil de Aquino Farias

**Pró-Reitora de Administração**

Prof<sup>a</sup>. Denise Maria Moreira Chagas Corrêa

**Imprensa Universitária**

**Diretor**

Joaquim Melo de Albuquerque

**Editora UFC**

**Diretor e Editor**

Prof. Antonio Cláudio Lima Guimarães

**Conselho Editorial**

**Presidente**

Prof. Antonio Cláudio Lima Guimarães

**Conselheiros**

Prof<sup>a</sup>. Adelaide Maria Gonçalves Pereira

Prof<sup>a</sup>. Angela Maria R. Mota Gutiérrez

Prof. Gil de Aquino Farias

Prof. Ítalo Gurgel

Prof. José Edmar da Silva Ribeiro

**José Luciano Bezerra Moreira  
Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Cristiane Cunha Frota**

# **Visualização bacteriana e colorações**



**Fortaleza  
2015**

## **Visualização bacteriana e colorações**

Copyright © 2015 by José Luciano Bezerra Moreira, Cibele Barreto Mano de Carvalho, Cristiane Cunha Frota.

Todos os direitos reservados

IMPRESSO NO BRASIL / PRINTED IN BRAZIL

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC)  
Av. da Universidade, 2932, fundos – Benfica – Fortaleza – Ceará

### **Coordenação editorial**

Ivanaldo Maciel de Lima

### **Revisão de texto**

Yvantelmack Dantas

### **Normalização bibliográfica**

Luciane Silva das Selvas

### **Programação visual**

Sandro Vasconcellos / Thiago Nogueira

### **Diagramação**

Víctor Alencar

### **Capa**

Heron Cruz

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Bibliotecária Luciane Silva das Selvas CRB 3/1022

---

M838v      Moreira, José Luciano Bezerra  
                 Visualização bacteriana e colorações / José Luciano Bezerra Moreira,  
                 Cibele Barreto Mano de Carvalho, Cristiane Cunha Frota - Fortaleza: Imprensa  
                 Universitária, 2015.  
                 68 p. : il. ; 21 cm. (Estudos da Pós-Graduação)

ISBN: 978-85-7485-238-6

1. Microbiologia. 2. Microbiologia médica. 3. Bacteriologia. I. Moreira, José Luciano Bezerra, org. II. Carvalho, Cibele Barreto Mano de, org. III. Frota, Cristiane Cunha, org. IV. Título.

---

CDD 576

## APRESENTAÇÃO

A microbiologia clínica e laboratorial avançou muito nas últimas décadas. Com o surgimento da automação e dos métodos moleculares, o diagnóstico etiológico de muitos processos infecciosos passou a ser realizado com maior rapidez, acompanhando a necessidade médica de um diagnóstico rápido para o tratamento de um paciente grave. Entretanto, a primeira etapa do exame bacteriológico, o exame microscópico do material clínico, permanece como uma etapa de muito valor para o microbiologista e o infectologista.

Nos últimos anos trabalhando como microbiologistas clínicos e como docentes da graduação e da pós-graduação, os autores têm observado a dificuldade dos alunos de perceberem a importância do exame microscópico, os fundamentos das colorações utilizadas, a relação entre este diagnóstico rápido e presuntivo e o estabelecimento do diagnóstico e terapêutica pelo infectologista. Assim, visualizamos esta lacuna e uma necessidade de focarmos este assunto, atualizando-o.

Acreditamos que os assuntos aqui abordados possam, de fato, agregar valores à prática dos alunos de pós-graduação, principalmente os da área da Microbiologia Médica que lidam diretamente com infecções nas suas mais diversas abordagens.

**Os autores**



## AGRADECIMENTOS

Este livro contou com o estímulo gerado pelos questionamentos dos alunos da pós-graduação em Microbiologia Médica que cursaram a disciplina de Bacteriologia.

Em especial agradecemos:

Ao Professor José Júlio Costa Sidrim pela contribuição ao conteúdo e pela revisão do texto além de um especial agradecimento pela doação das figuras contidas neste livro e confeccionadas pelo referido professor.

À Professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica pelo apoio incondicional a esta iniciativa.

À estudante de pós-doutorado Débora Castelo Branco e à estudante de mestrado Cecília Leite Costa do Programa do pós-graduação em Microbiologia Médica, pela ajuda na confecção das fotos.

Aos estudantes de medicina Francisco José Cândido e Thaís Soares de Lima, bolsistas do Programa *Jovens Talentos para a Ciência* pela realização, em acompanhamento com os autores, da seleção das lâminas, visualização e realização das fotos.

Ao técnico do laboratório de Bacteriologia José Olavo de Moraes pela contribuição em todos os momentos.





# CONTEÚDO

<b>CITOLOGIA BACTERIANA</b> .....	<b>11</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>11</b>
<b>Estruturas da célula bacteriana</b> .....	<b>13</b>
Parede bacteriana .....	13
Membrana citoplasmática .....	16
Cápsula e Glicocálice.....	18
Flagelo .....	19
<i>Pili</i> ou Fímbrias.....	21
Citoplasma .....	22
Endósporo .....	24
<b>COLORAÇÕES</b> .....	<b>27</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>27</b>
<b>Classificação das bacterioscopias</b> .....	<b>28</b>
<b>Coloração de Gram</b> .....	<b>29</b>
Histórico .....	29
Técnica de Gram.....	30
Fundamentos da coloração de Gram.....	31
Variações da coloração de Gram.....	34
Sensibilidade e especificidade.....	36
Importância clínico-laboratorial da coloração de Gram....	36
Diferentes técnicas de coloração de Gram .....	40
Controle de qualidade.....	43
<b>Tamanho e forma das bactérias</b> .....	<b>44</b>
<b>Microbiota normal humana</b> .....	<b>47</b>
<b>Microbiota predominante nos sítios colonizados</b> .....	<b>48</b>
<b>Bacterioscopia de sítios estéreis</b> .....	<b>50</b>
<b>Bacterioscopia de sítios com microbiota normal</b> .....	<b>51</b>
Secreções purulentas .....	51

Fezes .....	52
Secreção vaginal .....	53
Secreção uretral.....	55
Urina.....	55
Escarro .....	56
<b>Coloração de Ziehl-Neelsen.....</b>	<b>58</b>
Introdução.....	58
Técnica de Ziehl-Neelsen.....	59
Nota Clínica .....	61
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>63</b>
<b>SOBRE OS AUTORES.....</b>	<b>67</b>

# CITOLOGIA BACTERIANA

## Introdução

Quando se fala em morfologia celular, a estrutura que primeiro vem à mente é de uma célula eucariótica com sua membrana celular e seu espaço nuclear bem delimitados. Entretanto, existe outra forma de estrutura celular, típica dos seres procarióticos, os quais, apesar de serem mais rudimentares, apresentam uma forma de vida bem mais adaptada às condições ambientais. Em síntese, dependendo de sua estrutura celular, os seres vivos podem ser classificados em seres procarióticos e eucarióticos.

As bactérias, como representantes dos seres procarióticos, foram selecionadas na natureza pela sua elevada capacidade de adaptar-se ao ambiente que as cerca, em virtude de sua grande taxa de multiplicação, bem como por sua elevada taxa metabólica. Desta forma, estes seres peculiares foram e ainda são utilizados no estudo de técnicas genético-moleculares e análises bioquímicas, que vêm sendo empregadas nos diferentes campos da microbiologia.

A denominação “espécie” foi inicialmente utilizada para indivíduos capazes de realizar reprodução sexual; quando se emprega esse termo, é a esse tipo de seres que se faz referência. Entretanto, no tocante às bactérias, indivíduos que só se reproduzem de forma assexuada, esta terminologia, apesar de não ser corretamente utilizada, costuma ser empregada para um grupo de bactérias que apresentam características fenotípicas e genéticas comuns.

As normas taxonômicas agrupam as bactérias de forma crescente em: espécie, gênero, família e ordem. Desta forma, define-se “espécie bacteriana” como um conjunto de indivíduos ou cepas isoladas de forma independente e que mantêm características genéticas comuns evidenciadas por sua expressão fenotípica. O conjunto de espécies bacterianas que mantêm algum grau de identidade, agrupamos em gênero e estes, por sua vez, seguindo graus de semelhança, são agrupados em famílias que, por último, são agrupadas em ordens.

Somente nos anos 1950, com o aparecimento de técnicas de corte muito finos e com o advento da microscopia eletrônica, foi que a ultraestrutura bacteriana pôde ser revelada, bem como melhor estudadas as células eucarióticas. Comparativamente, seres procarióticos se caracterizam por sua pequena dimensão e ausência de membranas intracelulares. Os eucarióticos, por sua vez, apresentam um retículo endoplasmático e uma membrana nuclear envolvendo o nucléolo e os cromossomos e, diferentemente das células procarióticas, apresentam, ainda, aparelho de Golgi, lisossomo, mitocôndrias e microtúbulos (Figura 1).

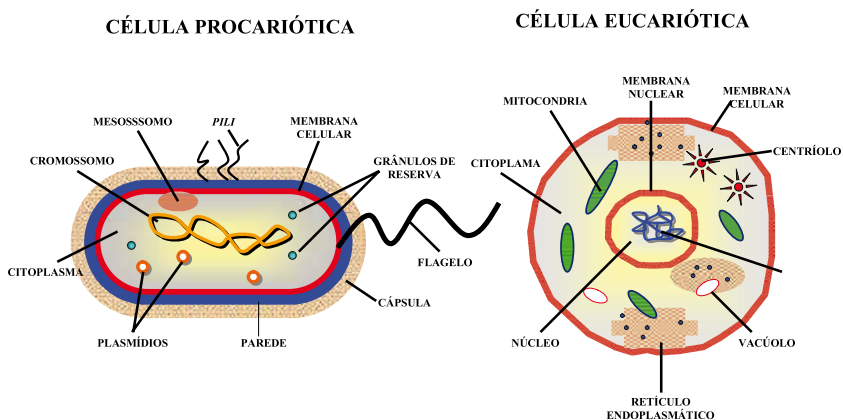


Figura 1 – Representação esquemática de uma célula procariótica e de uma célula eucariótica.  
Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

A ultraestrutura típica de uma célula procariótica é composta de parede, membrana citoplasmática, citoplasma e região nuclear (constituída de um só cromossomo). Outras estruturas podem ou não ser observadas em

células bacterianas, na dependência da espécie e/ou cepa em questão; por conseguinte, podem ser observadas, ainda, a presença de cápsula, mesosomos, flagelos, pili, fimbria, endósporo e plasmídios.

## **Estruturas da célula bacteriana**

### Parede bacteriana

Uma das principais estruturas bacterianas é a parede que mantém a resistência mecânica às diferenças de osmolaridade entre os meios intra e extracelular, é responsável por manter a forma bacteriana e serve de suporte sólido para estruturas de locomoção, como os flagelos. Além do mais, é através da composição da parede bacteriana que se faz a diferenciação primária dos grupos bacterianos. A estrutura da parede bacteriana difere sobremaneira em dois grupos específicos de bactérias, as chamadas Gram-negativas e as chamadas Gram-positivas.

Até a segunda metade do século XIX, quando as bactérias começaram a ser aventadas como causa de patologias humanas, observavam-se as bactérias apenas no tocante à forma. Entretanto, em 1884, um médico dinamarquês, Hans Christian Gram, idealizou uma técnica de coloração que ficou conhecida como “coloração de Gram”, sendo esta utilizada até os dias atuais como a mais importante coloração em microbiologia. Esta técnica é utilizada para diferenciar as bactérias não só quanto à forma, mas, também, quanto à sua habilidade de ser corada pelo corante de Gram (cristal violeta) e não ser descorada quando tratada com álcool. São denominadas Gram-positivas as que mantêm o corante e Gram-negativas as que perdem o corante após o tratamento com álcool.

A parede bacteriana é a principal implicada na diferenciação da coloração de Gram, e este comportamento reflete a diferença na composição química da parede das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A parede das bactérias Gram-positivas caracteriza-se por uma espessa camada de peptidoglicano, também conhecido como mureína ou mucopeptídeo, enquanto nas bactérias Gram-negativas a camada de peptidoglicano é muito delgada; entretanto, a estrutura da parede das Gram-negativas é bem mais complexa do ponto de vista químico.

Nas bactérias Gram-positivas a estrutura da parede bacteriana é unitária, composta por muitas camadas de peptidoglicano formando uma estrutura espessa (Figura 2).

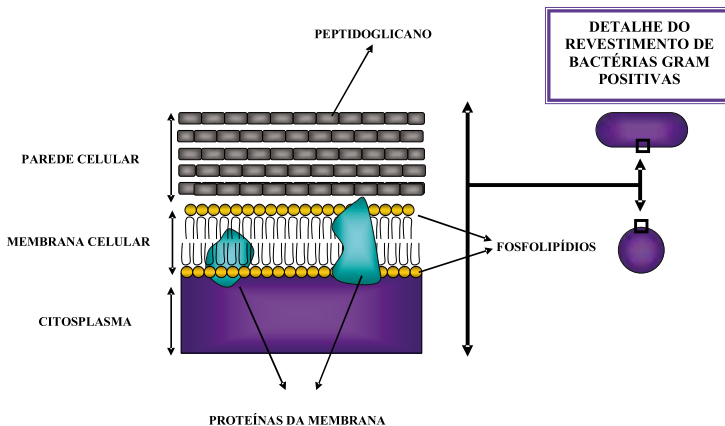


Figura 2 – Aspecto esquemático do citoplasma e camadas de revestimento das bactérias Gram-positivas.

Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

Nas bactérias Gram-negativas, a complexidade se manifesta pela presença de duas diferentes camadas, quais sejam membrana externa e peptidoglicano (Figura 3).

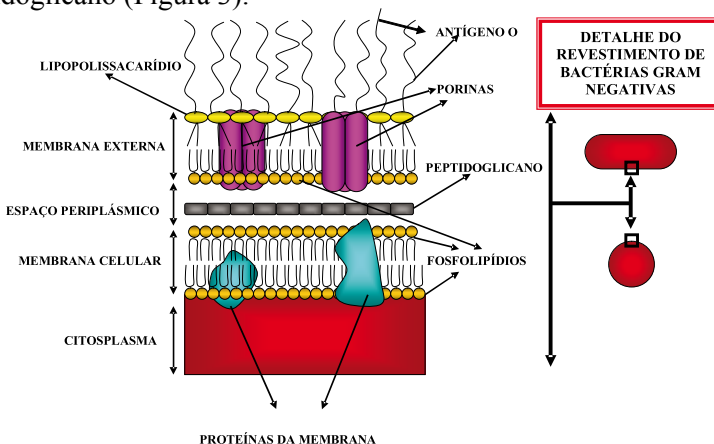


Figura 3 – Aspecto esquemático do citoplasma e camadas de revestimento das bactérias Gram-negativas.

Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

O peptidoglicano é composto de polímeros mistos de glicanos lineares (ácido N- acetilglicosamina e ácido N- acetilmurâmico) ligados uns aos outros por cadeias laterais de aminoácidos (Figura 4).

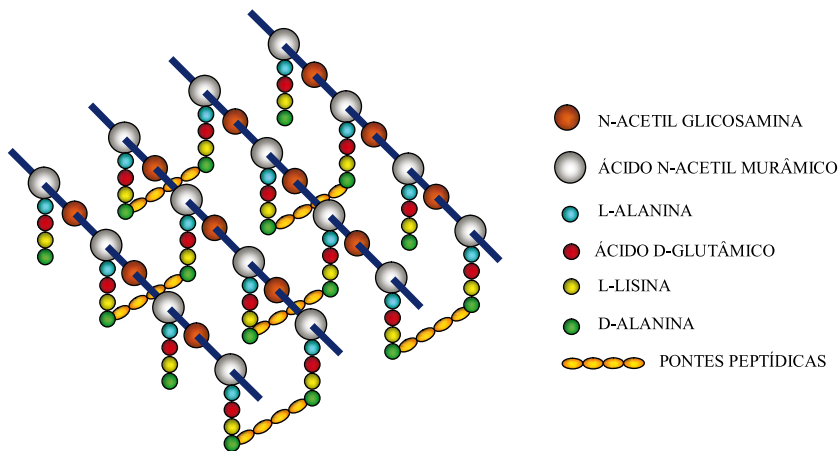


Figura 4 – Representação esquemática do peptidoglicano.  
Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

A camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-negativas é fina e contribui apenas com 5 a 10% do peso seco da parede celular. Externamente à camada de peptidoglicano está a membrana externa. A membrana externa é constituída de dupla camada de fosfolipídios, com a camada interna semelhante às membranas celulares. Entretanto, o folheto externo dessa membrana detém em sua composição, no lugar dos fosfolipídios, uma molécula complexa denominada de lipopolissacarídeo (LPS) (Figura 5).

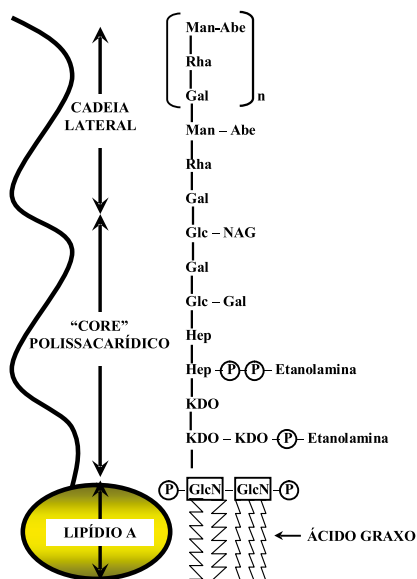


Figura 5 – Correlação esquemática do LPS e sua composição química.

Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.



Este LPS, fornece duas características importantes às bactérias Gram-negativas. A primeira é que a porção polissacarídica do LPS, chamada polissacarídeo O, atua como antígeno e é útil para diferenciar as espécies de bactérias Gram-negativas. A segunda é que esta molécula possui uma porção lipídica chamada lipídio A, que é tóxica e denominada endotoxina da bactéria Gram-negativa, e é um poderoso estimulador das respostas naturais e imunes. O resultado desse conjunto é uma membrana extremamente assimétrica, resistente a produtos corrosivos e capaz de repelir compostos hidrofóbicos.

Imerso na membrana externa, são observadas, ainda, as porinas, que são canais constituídos de moléculas proteicas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos com massa inferior a 600-700 daltons, como, por exemplo, os açúcares, ácidos aminados e alguns íons.

A membrana externa, a camada de peptidoglicano e a membrana citoplasmática não são estruturas isoladas, estando ligadas entre si. A membrana externa liga-se ao peptidoglicano através de suas lipoproteínas e, por sua vez, a ligação entre a membrana externa e a membrana citoplasmática ocorre através de sítios de adesão as quais periodicamente são feitas e desfeitas. A área entre a superfície externa da membrana citoplasmática e a superfície interna da membrana externa é denominada espaço periplasmático. Neste espaço a bactéria armazena uma variedade de enzimas hidrolíticas que são importantes para o seu metabolismo. Outras enzimas, algumas consideradas fatores de virulência, como hialuronidases, colagenases e beta-lactamases, também estão no espaço periplasmático.

## Membrana citoplasmática

Revestindo o citoplasma, logo abaixo da parede, a membrana celular bacteriana apresenta uma estrutura semelhante às membranas celulares que revestem as células eucarióticas. Tal membrana é formada por dupla camada de fosfolipídios, com matrizes proteicas imersas nesta estrutura, mas não contém esteróis, com exceção dos micoplasmas (Figura 6).

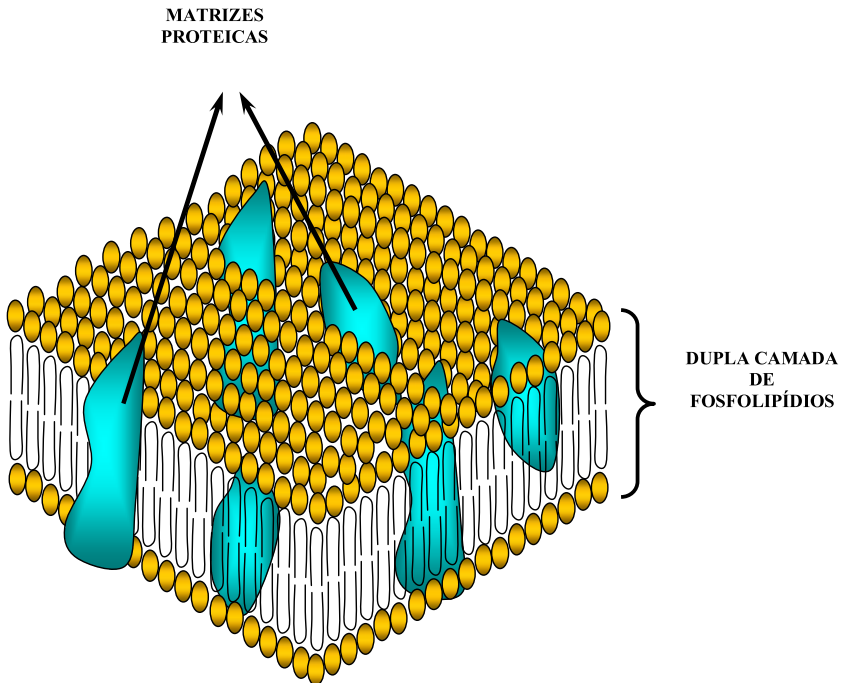


Figura 6 – Modelo tridimensional da membrana celular bacteriana, evidenciando-se, em sua composição, uma dupla camada de fosfolípídios entremeadas por estruturas proteicas, que se projetam, tanto para o espaço intra como extracelular, conferindo um aspecto de “mosaico fluido” à membrana celular.

Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

Funcionalmente, a membrana celular serve de barreira osmótica, que pode ser modificada por sistemas específicos de transporte para nutrientes e íons; participa da síntese de peptidoglicano parietal, lipídios da própria membrana e dos lipopolissacarídeos nas bactérias Gram-negativas; produz e secreta proteínas extracitoplasmáticas, encontradas na membrana celular, espaço periplasmático, membrana externa e parede e participa do transporte de elétrons na respiração bacteriana.

Os mesossomos são achados particulares da membrana celular, caracterizados por invaginações que formam estruturas concêntricas responsáveis pela origem do septo transversal, que divide a célula em duas, sendo o sítio de ligação do DNA na duplicação bacteriana.

## Cápsula e Glicocálice

Tanto as bactérias Gram-positivas como as Gram-negativas podem apresentar um envoltório de mucopolissacarídeo, de elevado peso molecular, que não é essencial para manutenção da viabilidade bacteriana. Esta estrutura pode ser produzida, mais ou menos intensamente, na dependência do meio e nutrientes em que este micro-organismo está crescendo. A cápsula bacteriana pode ser dividida funcional e estruturalmente em dois tipos: as cápsulas frouxas, responsáveis pela adesão bacteriana denominadas de glicocálice; e as cápsulas mais densamente condensadas, que têm como função básica a inibição da fagocitose, denominadas também de cápsula propriamente dita.

A cápsula é considerada um fator de virulência em algumas espécies bacterianas, pois, por inibir a fagocitose, facilita a propagação de determinado micro-organismo e instalação de um processo infeccioso. Essa situação é bem exemplificada com as cepas capsuladas de *Nisseria meningitidis* – que necessitam sair da orofaringe para a corrente sanguínea sem serem fagocitadas – e, por conseguinte, atingir as meninges para estabelecer o quadro de meningite meningocócica.

Apesar de o glicocálice não ser vital para a célula bacteriana, ele se faz de extrema importância quando observamos a capacidade que alguns microrganismos têm de colonizar determinados sítios. Esta situação pode ser bem exemplificada com o *Streptococcus mutans*, que adere à superfície dentária do hospedeiro, através do glicocálice, iniciando a formação do biofilme e posteriormente da cárie dental.

Biofilme pode ser definido como uma comunidade multicelular altamente organizada de micro-organismos, entre eles as bactérias, envolvidas numa matriz de polímero extracelular, onde se concentram produtos do seu metabolismo juntamente com íons e nutrientes sequestrados do ambiente ecológico e em adesão a uma superfície biótica ou abiótica. A formação do biofilme é orquestrada por comunicações químicas, essenciais para o adequado crescimento e para o desenvolvimento dos organismos que vivem no biofilme. Essa comunicação é dependente da densidade populacional e o sistema é ativado

em resposta a moléculas bioquímicas sinalizadoras chamadas de auto indutores. Este sistema é denominado de *quorum sensing*. É uma comunicação sofisticada usada para propagar várias atividades biológicas além da formação do biofilme, como produção de fatores de virulência e esporulação. Inicialmente descritos no meio ambiente, nas três últimas décadas, os biofilmes têm sido descritos relacionados a infecções humanas, seja associadas a dispositivos médicos implantados ou não. As infecções crônicas, como fibrose cística, osteomielite, otite média crônica, entre outras têm sido associadas a bactérias em biofilme. Como as técnicas para o estudo dos biofilmes ainda não estão padronizadas, o diagnóstico laboratorial (bacteriológico) representa um grande desafio para a bacteriologia atual.

## Flagelo

A locomoção bacteriana geralmente se faz através de estruturas móveis, ancoradas à membrana celular, denominadas de flagelos. Entretanto, o deslocamento bacteriano de algumas espécies, que não apresentam importância em patologia humana e animal, pode ser feito por deslizamento, prescindindo, assim, do flagelo.

O flagelo é constituído de três estruturas distintas, tais como: filamento, gancho e corpo basal. O filamento possui comprimento de 5 a 10 $\mu$ m a partir da superfície da célula, sendo constituído de um só tipo de proteína, denominada flagelina. Este filamento está ligado ao corpo basal pelo gancho, e o corpo basal, por sua vez, repousa sobre a membrana celular, servindo de motor para a rotação do flagelo (Figura 7).

O gancho é constituído de moléculas proteicas, de um só tipo, conhecidas como proteínas do gancho, que se agrupam formando uma estrutura curta e curva. O corpo basal, por sua vez, apresenta um eixo central com discos, cada um deles repousando sobre uma diferente camada do revestimento da célula bacteriana. Nas bactérias Gram-negativas, observam-se quatro discos, sendo um na membrana externa, um na parede e dois na membrana celular. Por outro lado, nas Gram-positivas, há dois discos, sendo um na membrana citoplasmática e

outro na parede. Desta forma, a bactéria desloca-se através do movimento do corpo basal que, em última instância, gira o flagelo no sentido horário ou anti-horário, ocasionando, respectivamente, movimentos de cambalhota ou propulsão bacteriana, já que os flagelos são normalmente hélices levóginas. Apesar de este movimento ser aparentemente aleatório, faz parte de um sistema comportamental, que aproxima ou afasta uma bactéria de um ambiente favorável ou desfavorável ao seu crescimento.

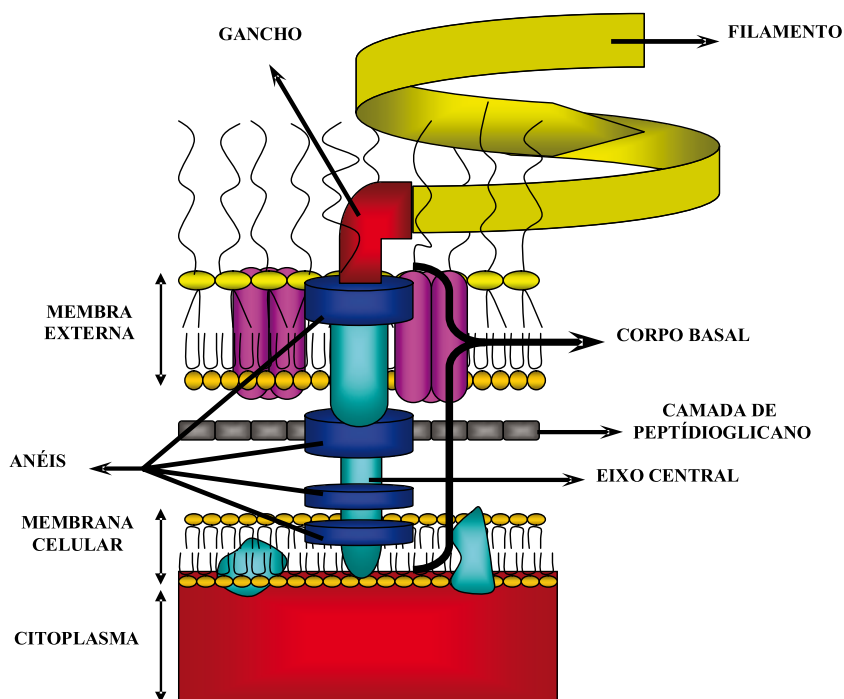


Figura 7 – Esquema da ancoragem do flagelo nos folhetos de revestimento celulares em uma bactéria Gram-negativa, ressaltando-se as principais estruturas componentes do flagelo (filamento, gancho e corpo basal).

Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

Quanto ao número de flagelos, as células bacterianas podem ser classificadas como: atríquias (sem flagelos), monotríquias (apenas um flagelo em uma extremidade), multitríquias (mais de um flagelo distribuídos de forma aleatória no corpo bacteriano), e lofotríquios

(dois ou mais flagelos em uma extremidade da bactéria). Por outro lado, quanto à disposição dos flagelos, nas células bacterianas, estas são classificadas como: peritríquias (distribuídos em toda a superfície bacteriana) e anfitríquias (um ou mais flagelos em ambas as extremidades da célula bacteriana) (Figura 8).

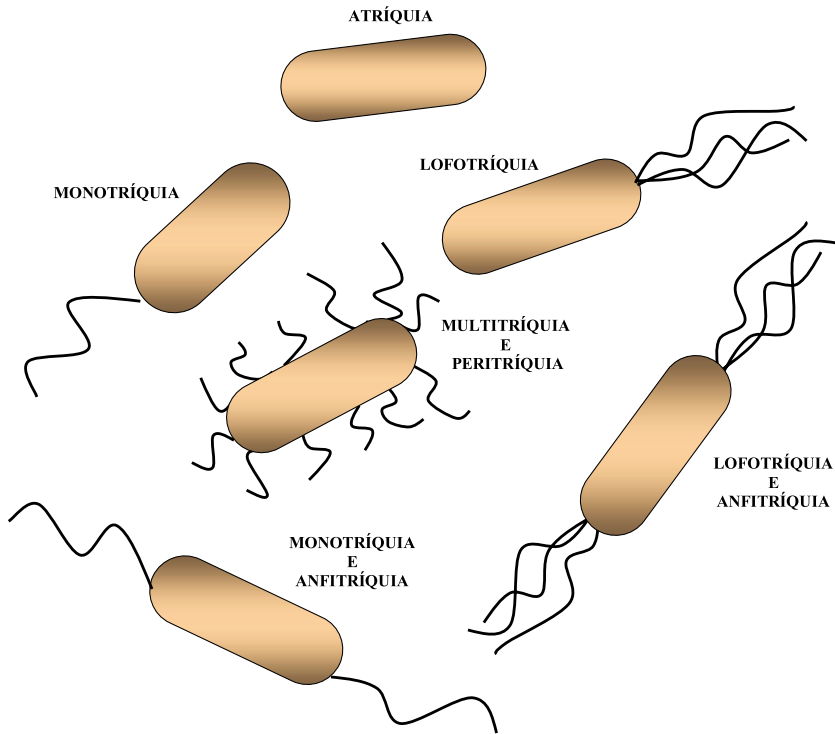


Figura 8 – Desenho esquemático da classificação bacteriana quanto à presença de flagelos. Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

### *Pili* ou Fímbricas

Estas formações são constituídas de um ou vários tipos de proteínas estruturais, denominadas pilinas, que se dispõem em arranjo helicoidal, formando uma estrutura tubular com origem na membrana celular e que se estende para fora da superfície externa bacteriana em 0,2 a 2  $\mu\text{m}$ .

Funcionalmente os pilis estão implicados na adesão da bactéria a sítios específicos da célula eucariótica. Desta forma, os pilis relacionados à adesão são denominados de pilis comuns. Existem, ainda, os pilis sexuais que, funcionalmente, desempenham papel fundamental na conjugação bacteriana, servindo, portanto, de canal para a transferência de material genético entre as bactérias que estão realizando um processo de conjugação.

## Citoplasma

O citoplasma das células procarióticas caracteriza-se por um material denso, amorfo e granuloso, estando esta última característica relacionada com a presença de ribossomos. Além do mais, a região nuclear, onde encontramos a maior parte do DNA bacteriano, apresenta-se como uma área sem limites precisos. O contato íntimo no citoplasma, entre DNA e uma abundante maquinaria de produção proteica, confere à célula bacteriana a característica de um ser vivo com elevada taxa metabólica e fantástica capacidade de reprodução e adaptação ao ambiente.

Os ribossomos bacterianos, quando centrifugados, sedimentam numa velocidade de 70 unidades *svedberg* (S), por isto, são conhecidos como 70S, distinguindo-se dos das células eucarióticas que possuem uma velocidade de sedimentação de 80S. Os ribossomos 70S das células bacterianas são constituídos de duas subunidades que, quando centrifugadas em separado, resultam em uma unidade de 50S e outra de 30S.

Os grânulos de reserva são inclusões eletrodensas, irregulares, com diâmetros de 20-100nm, observadas no citoplasma de determinadas bactérias, que servem como reserva de substância nutritiva a ser utilizada pela bactéria, em casos de privação nutricional. Em adição, nem todo grânulo acumulado é do mesmo tipo, apesar de a maioria ser de glicogênio. Então, são encontrados grânulos dos tipos: polifosfato, lipídios e fósforo elementar. Vale ressaltar, ainda, que algumas inclusões muito semelhantes aos grânulos não têm função de reserva, mas, sim, funções específicas, como os grânulos de ferro, acumulados por bactérias que apresentam taticismo por campos magnéticos, isto é, estas bactérias se locomovem na dependência da exposição a um determinado campo magnético.

No citoplasma encontramos uma região nuclear central onde está localizada uma molécula de DNA superespiralada e fechada covalentemente. Por analogia às células eucarióticas, o DNA bacteriano é considerado um cromossomo, de sorte que cada bactéria possui apenas um cromossomo. Desta forma, quando há referência à bactéria, os termos núcleo, nucleóide, cromossomo e DNA bacteriano são utilizados quase como sinônimos.

O comprimento de um cromossomo bacteriano chega a ser mais de 1000 vezes maior do que a dimensão de uma bactéria. Assim, para que a bactéria possa conter essa estrutura, o DNA apresenta elevada capacidade de enovelamento. Por esta razão, o DNA bacteriano tende a ficar circunscrito a uma única região, não se espalhando por todo o citoplasma. Desta forma, o núcleo bacteriano apresenta-se à microscopia eletrônica como um corpúsculo amorfo e radiado do centro celular.

Elementos genéticos extra cromossômicos podem ser encontrados no citoplasma como por exemplo os plasmídios e transposons. Os plasmídios são moléculas de DNA circulares, superenoveladas e autoduplicáveis, que foram descritos inicialmente em enterobactérias e, posteriormente, na maioria das espécies bacterianas. Estes *replicons* se apresentam em tamanhos variados, desde plasmídios crípticos muito pequenos e sem função conhecida, de menos de 2.500 pares de nucleotídeos, até plasmídios grandes e complexos, de mais de 40.000 pares de nucleotídeos. Eles exibem várias propriedades, entre as quais a habilidade de transferir material genético na conjugação.

Uma célula bacteriana pode conter numerosos plasmídios distintos funcionalmente e cada um com replicação independente. Seu material genético pode ser responsável por importantes funções na bactéria, mas, geralmente, não vitais, como: produção de bacteriocinas, endotoxinas, substâncias com ação antimicrobiana, fatores de virulência, resistência aos antimicrobianos e a metais pesados. Seu material genético possui pouca ou nenhuma homologia de sequência de nucleotídeos, quando comparado ao cromossomo da célula bacteriana que o alberga. Sendo assim, estes elementos podem ser considerados como estranhos à célula.



Os plasmídios podem passar por alterações radicais na sua estrutura e fornecer material genético, por pressão seletiva, sem alterar a viabilidade da bactéria. Podem integrar-se como um todo, ou parcialmente, ao cromossomo bacteriano, através de sequências de inserção presentes tanto no plasmídio como no DNA cromossômico, as quais apresentam regiões de homologia para recombinação. Um exame detalhado de plasmídios íntegros revelou que a estrutura secundária em dupla hélice apresenta-se retorcida, originando uma estrutura terciária em forma de novelo.

Desta forma, a maioria das espécies bacterianas, patogênicas para o homem, apresenta plasmídios contendo genes que conferem à bactéria resistência a um ou a vários antimicrobianos (conhecidos como plasmídios R) ou, ainda, plasmídios que facilitam a absorção e metabolização de determinados substratos, conferindo a esta célula bacteriana características de supremacia frente a outras que não utilizam o mesmo substrato.

## Endósporo

Alguns gêneros bacterianos, como por exemplo *Bacillus* e *Clostridium* (bacilos Gram-positivos), podem passar por um processo de diferenciação celular chamado *esporulação* que resulta na transformação da célula vegetativa em esporo, o qual é química e morfológicamente diferente da célula mãe. Este processo geralmente ocorre quando a bactéria está submetida a “stress” físico (calor) ou químico (carência de nutrientes). É um processo geneticamente coordenado que se inicia com a desrepressão do gene que leva à síntese de RNAm e que vai dar início à produção do esporo. O processo se inicia com a formação do esporo dentro do citoplasma da bactéria. A membrana citoplasmática sofre invaginação que isola o DNA bacteriano e o circunda. Este septo torna-se uma membrana dupla e em seguida é circundado por uma camada de peptidoglicano. Em torno desta membrana, forma-se uma capa proteica tipo queratina, que protege o esporo e é considerada responsável por sua resistência a muitos agentes químicos. Durante o processo de esporulação a célula expulsa água deixando o esporo desidratado. Os esporos não realizam

atividades metabólicas e em seu centro são encontrados o DNA, ribossomos, enzimas e dipicolinato de cálcio.

Durante o processo de esporulação, pode ser observado o esporo no interior do bacilo ocupando posição central, subterminal ou terminal, dependendo da espécie bacteriana. No final do processo a parede celular se rompe matando a célula e liberando o esporo (Figura 9). Os esporos são importantes do ponto de vista médico-odontológico e laboratorial, pois são resistentes a muitos agentes físicos, químicos, dessecação, congelamento e radiação. Podem também sobreviver em água em ebulição por várias horas. Podem sobreviver no ambiente hospitalar como ocorre com o *Clostridium difficile*, considerado atualmente a causa mais importante de diarreia nosocomial. O *C. difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos, o que possibilita a sua persistência nos doentes, e no ambiente, por longos períodos, facilitando a sua transmissão, por via fecal-oral.

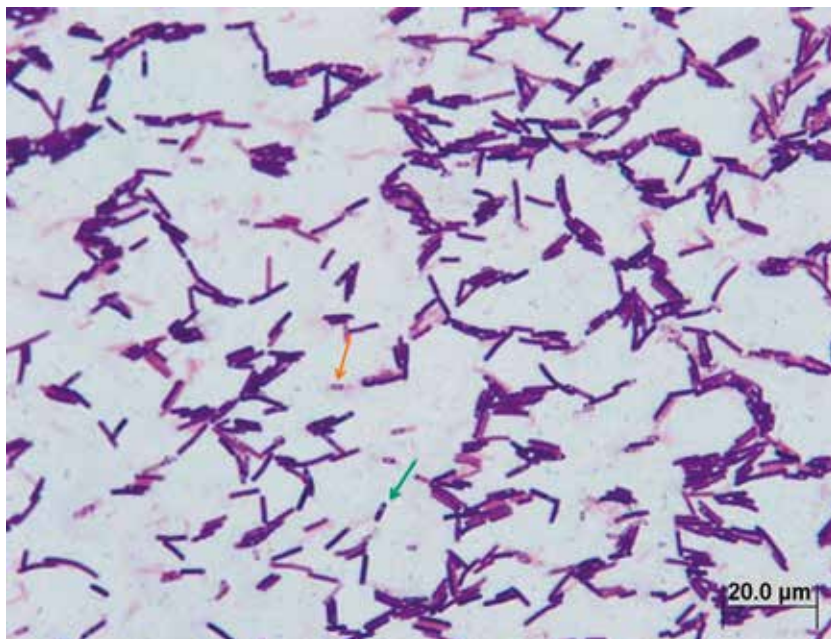


Figura 9 – Coloração de Gram (1000x). Bacilos Gram-positivos, alguns apresentando endosporos (seta verde). Presença de esporos livres (seta laranja).

Fonte: próprio autor.

Quando em ambiente nutricionalmente favorável, se inicia o processo de germinação do esporo. O rompimento da capa proteica pode ocorrer dependente de estresse mecânico, alteração de pH, calor ou outros fatores. Quando o processo de germinação começa o esporo absorve água, rompe suas capas e produz uma nova célula vegetativa idêntica à célula vegetativa original.

# COLORAÇÕES

## Introdução

O exame microscópico (bacterioscopia), ou seja, a análise em microscópio de bactérias, consiste na primeira etapa laboratorial para a identificação de uma bactéria causadora de um processo infeccioso. A bacterioscopia pode fornecer um diagnóstico presuntivo que é completado com a cultura, a qual fornece o diagnóstico de certeza. O método objetiva detectar a presença ou ausência de bactérias diretamente na amostra clínica e permite observar e analisar a forma e organização ou agrupamento das bactérias. Embora de importância secundária, outros elementos podem ser revelados na bacterioscopia como, por exemplo, leucócitos, cistos de protozoários, larvas de helmintos, entre outros.

O significado da presença ou ausência de bactérias depende do local da coleta da amostra. Amostras colhidas de sítios anatômicos estéreis, isto é, de locais isentos de micro-organismos (por exemplo, líquido), devem resultar em ausência de bactérias. Nestes casos, a presença de bactérias assume valor de diagnóstico presuntivo. Por outro lado, o achado de bactérias em preparações oriundas de sítios anatômicos que albergam uma microbiota normal (por exemplo, orofaringe), precisa ser interpretado sob critérios distintos.

O resultado da bacterioscopia sempre deve ser correlacionado com a cultura, sendo de modo geral concordante.

## Classificação das bacterioscopias

A bacterioscopia pode ser feita de duas maneiras: a fresco e corada. O exame a fresco fundamenta-se na observação de microrganismos vivos, em suspensão do material biológico entre lâmina e lamínula, onde podem ser observadas as formas e os movimentos dos mesmos. O exemplo clássico é o da pesquisa de *Treponema pallidum* em preparações a fresco para o diagnóstico da sífilis. A bacterioscopia corada, por sua vez, é realizada em esfregaços de amostras, que uma vez secos e fixados, são submetidos a um método de coloração. Neste caso bactérias mortas são examinadas. Quanto aos tipos de coloração temos a seguinte classificação:

**1) Coloração simples** – são colorações nas quais se utiliza apenas um corante. Podem ser positivas, quando as bactérias são coradas (ex.: azul de metileno, safranina, cristalvioleta) ou negativas, quando a bactéria não é corada mas a sua célula contrasta com o corante circundante (ex.: tinta da china, nigrosina).

**2) Coloração diferencial** – são colorações em que são empregados dois corantes contrastantes que vão gerar cores diferentes em grupos distintos de bactérias. São exemplos de colorações diferenciais a coloração de Gram e a de Ziehl-Neelsen.

**3) Coloração especial** – são aquelas utilizadas para corar e identificar partes específicas das células bacterianas como esporos, flagelos ou ainda revelar a presença de cápsula.

Qualquer tipo de técnica para execução de preparações coradas envolve três etapas preliminares fundamentais: preparar o esfregaço, deixar secar e fixar o esfregaço.

Preparar um esfregaço consiste em espalhar na superfície de uma lâmina de vidro uma suspensão bacteriana obtida de uma cultura em meio líquido ou meio sólido ou diretamente a partir de um material clínico (fezes, escarro, líquido pleural), utilizando-se alça bacteriológica. Após a execução do esfregaço, a lâmina é deixada para secar ao ar ou na estufa a 35/37°C. Após um tempo curto, entre 5 a 10 minutos, realiza-se a fixação do esfregaço na lâmina, o que pode ser feito pelo calor ou utilizando-se substâncias como etanol

(fixação química). Na fixação pelo calor, que objetiva que as células fiquem aderidas à lâmina e não sejam desprendidas durante o processo de coloração, segura-se a lâmina em uma das extremidades e são realizadas duas a três passagens pela chama do bico de Bunsen. A partir deste momento, o esfregaço está pronto para receber o processo de coloração.

## Coloração de Gram

### Histórico

Hans Christian Joachim Gram (1853-1938) nasceu em Copenhague em 1853. Seu pai foi Frederik Terkel Julius Gram, advogado e professor de jurisprudência; sua mãe foi Louise Christiane Roulund. Estudou medicina na Universidade de Copenhague e obteve o título em 1878. Durante vários anos exerceu a medicina como interno, e depois como médico residente, no Hospital Municipal de Copenhague. Realizou investigações sobre o número e tamanho dos glóbulos vermelhos, que o fizeram merecedor, em 1882, de uma medalha de ouro em sua Universidade. Sua tese de doutorado tratou deste tema. Gram viajou pela Europa durante dois anos, formando-se em farmacologia e bacteriologia. Estudou em Estrasburgo, Marburgo e Berlim. De regresso a Copenhague, se habilitou e foi ajudante de farmacologia entre 1886 e 1889. Em 1891, alcançou o grau de professor, cargo que desempenhou até 1900. Depois mudou de cátedra para a de patologia e terapêutica. Em 1892, foi nomeado chefe de Medicina interna no Hospital Kongelige Frederiks, posto que manteve até sua aposentadoria em 1923.

A figura de Gram é conhecida porque seu nome se converteu em epônimo que ainda hoje é utilizado, ainda que alguns desconheçam a sua origem. Gram estudou as técnicas de coloração das bactérias, trabalho que desenvolveu em Berlim quando trabalhava com Carl Friedländer (1847-1887). Seus trabalhos foram publicados na revista *Fortschritte der Medezin*. Gram afirmou: “Eu publiquei um método, mas sou consciente de que, todavia é defeituoso e imperfeito; porém desejo que em mãos de outros investigadores possa resultar útil”. Enquanto analisava

os tecidos dos falecidos por pneumonia, descobriu que algumas bactérias mantinham a coloração e outras não. Realizou a coloração com violeta de genciana, depois fixou com lugol e em seguida lavou com etanol. Havia bactérias que retinham a cor e apareciam de cor violeta ao microscópio e outras perdiam esta cor (por terem sido descoradas). Ele notou que estas bactérias descoradas podiam ser contracoradas com marrom de Bismarck ou vesuvina. Mais tarde Carl Weigert incorporou um novo corante ao processo; adicionou safranina depois da etapa de lavagem com etanol. Desta maneira as bactérias que não retinham a coloração inicial (violeta) apareciam coradas de vermelho, e foram chamadas de Gram-negativas, frente às que se coravam primitivamente de violeta que eram as Gram-positivas.

Gram foi na realidade um grande clínico. Manteve um consultório privado que teve muito êxito e que só parou quando se aposentou em 1923. Recebeu em vida o reconhecimento pessoal de seus colegas e de instituições de vários países. Morreu em Copenhague em 14 de novembro de 1938 (BECK, 2000).

## Técnica de Gram

A técnica de Gram compreende as seguintes etapas:

- 1) Preparar o esfregaço delgado em lâmina de vidro e deixar secar ao ar.
- 2) Fixar pelo calor ou por método químico.
- 2) Colocar a lâmina sobre um suporte para coloração e cobrir a superfície com solução de cristal violeta por 1 minuto.
- 3) Derramar o corante e lavar com água corrente.
- 4) Cobrir o esfregaço com solução de iodo de Gram durante 1 minuto. Lavar novamente com água.
- 5) Cobrir a superfície do esfregaço com algumas gotas do descorante álcool-acetona até que não haja mais desprendimento de cor violeta. Usualmente esse processo demora dez segundos ou menos. Lavar com água corrente.

- 6) Cobrir a superfície com o contra corante safranina durante 1 minuto. Lavar com água corrente.
- 7) Colocar a lâmina na posição vertical deixando que o excesso de água escorra e o esfregaço seque.
- 8) Examinar o esfregaço com óleo de imersão empregando objetiva de 100x do microscópio.

As bactérias Gram-positivas coram-se em violeta e as bactérias Gram-negativas, em vermelho. (Figura 10).

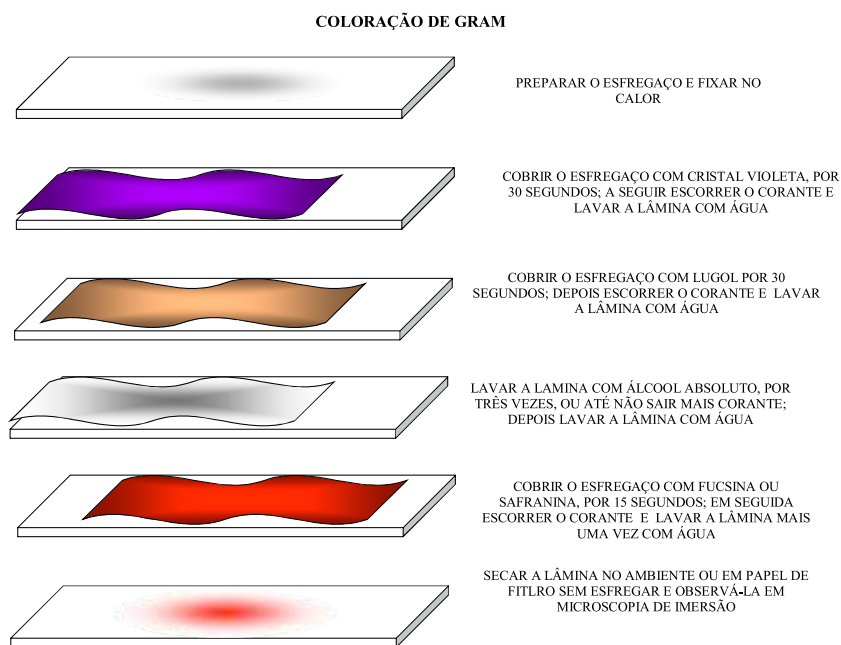


Figura 10 – Etapas da coloração de Gram.  
Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

## Fundamentos da coloração de Gram

O princípio ou fundamento da técnica de Gram se baseia na diferença da composição química da parede celular das bactérias e na ação do álcool sobre esta parede. Beck (2000) em seu livro *Acronology of Microbiology in historical context* relata que em 1884, quando C.



Gram publicou o artigo descrevendo a técnica de coloração, o fundamento pelo qual a diferença após a descoloração se estabelece não foi explicado. Em 1929, na tentativa de explicar o processo, V. Burke e M. W. Barnes concluíram que diferenças na permeabilidade da parede celular eram responsáveis pela rápida descoloração das bactérias Gram-negativas (após tratamento com álcool) ao contrário do que ocorria com as bactérias Gram-positivas. Em 1929, a estrutura química da parede celular das bactérias não havia sido ainda elucidada e os autores não conseguiram evidências químicas para comprovar suas conclusões. Em 1957, Wensinck e J. J. Boevé também tentaram justificar a diferença na descoloração devido a diferenças na permeabilidade entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Enfim, em 1963, M. R. J. Salton concluiu que a diferença na coloração de Gram é dependente da criação de uma barreira de permeabilidade na bactéria Gram-positiva que ocorre após o tratamento com álcool. O álcool desidrata a espessa camada de peptidoglicano na bactéria Gram-positiva e leva à criação de pequenos poros que prendem o complexo cristal violeta-iodo dentro da célula; enquanto o tratamento com álcool na Gram-negativa leva a um aumento da permeabilidade devido à extração de lipídios da membrana externa.

Em resumo, existem duas teorias que tentam explicar a coloração de Gram, que não são excludentes, mas, sim, complementares. A primeira relaciona-se com a desidratação do peptidoglicano e tenta explicar a habilidade das bactérias Gram-positivas em reter o corante, haja visto que apresentam camada mais espessa de peptidoglicano, que pode atuar como uma rede que, ao perder água, sob a ação de um solvente orgânico, como o álcool a 95°, por exemplo, fecharia a sua malha, retendo, assim, o corante em seu interior. Já nas bactérias Gram-negativas, como a camada de peptidoglicano é muito delgada, sua desidratação não é condição suficiente para que ocorra o fechamento desta malha, extravasando, assim, o corante.

A segunda teoria relaciona-se com a lipossolubilidade dos componentes da parede bacteriana. As bactérias Gram-negativas, por apresentarem em sua composição grande quantidade de lipídios, formando a sua membrana externa, estes são solubilizados quando expostos ao

solvente orgânico, deixando escapar todo o corante que, porventura, tenha entrado na célula bacteriana. Já as bactérias Gram-positivas, por não apresentarem lipídios em sua composição, não sofrem esta ação.

Desta forma, as bactérias Gram-positivas, ao mesmo tempo em que desidratam e fecham a malha de peptidoglicano, não sofrem a ação das substâncias que solubilizam lipídios, retendo, assim, o corante. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas, apesar de também desidratarem sua camada de peptidoglicano, talvez em menor proporção – o álcool age primeiro na camada externa à camada de mureína – não conseguem reter o corante, em razão também de sua pequena espessura. Além do mais, a solubilização dos lipídios, pertencentes à sua membrana externa, facilita ainda mais o extravasamento do corante, tornando-as incolor. Assim, para a evidenciação das bactérias Gram-negativas, após a etapa da diferenciação, se utiliza um contracorante para facilitar sua visualização (Figura 11).

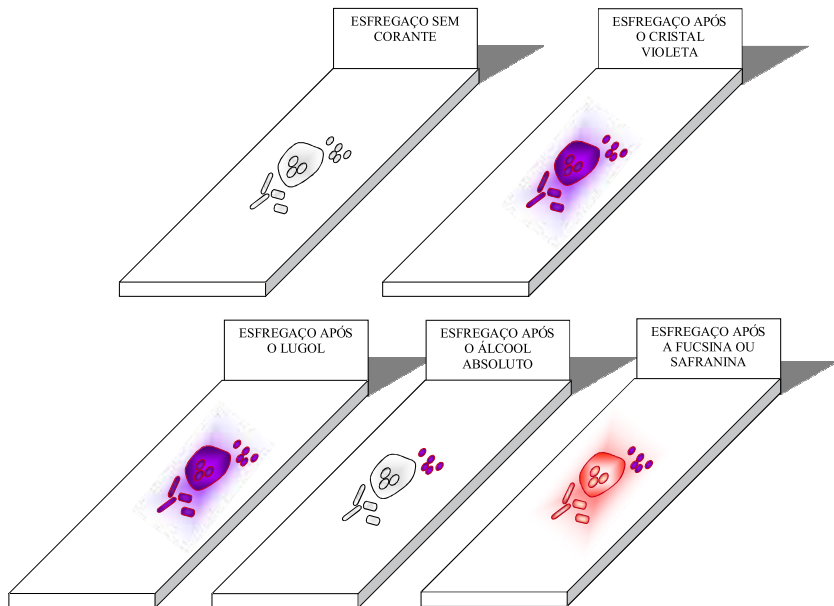


Figura 11 – Achados celulares de um esfregaço submetido à coloração de Gram, etapa por etapa. Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

## Variações da coloração de Gram

Apesar de a coloração de Gram ser a técnica mais difundida para a observação bacteriana, mesmo sendo realizada por profissionais qualificados, ela pode apresentar variações que devem ser interpretadas com precisão por um observador experiente. Desta forma, além das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que são pólos opostos da coloração de Gram, podem ser observados micro-organismos que apresentam uma Gram-labilidade, isto é, coram-se irregularmente ao Gram. Esta situação pode ser bem observada em células bacterianas que geralmente são Gram-positivas, mas que, em virtude da injúria celular por trauma ou por ação de antibacterianos, que agem na síntese da parede, ou ainda em células velhas, a habilidade de reter o corante não se faz evidente. Assim, no conjunto bacteriano, podem ser observadas células retendo bem o corante, outras retendo pouco e outras simplesmente não o retendo (Figura 12). Vale aqui ressaltar que o corante da metodologia de Gram é o cristal violeta, e não a fucsina, que é considerada apenas um contracorante. Por conseguinte, fica claro que, quando se refere à Gram-labilidade, esta se faz frente apenas ao cristal violeta, logo, para bactérias Gram-positivas. Além desta situação, a Gram-labilidade, também, pode ser expressa em populações bacterianas bem conservadas, onde, por característica da própria célula, como por exemplo, na população dos actinomicetos (bactérias filamentosas), esta retém de forma irregular o corante.

Uma boa metodologia de Gram deve mostrar populações Gram-positivas coradas de violeta intenso e células eucarióticas (leucócitos e células de revestimento contidas no material), bem como populações bacterianas Gram-negativas de róseo ou róseo alaranjado, na dependência do contracorante utilizado, seja fucsina ou safranina.

Assim, especial atenção deve ser tomada pelo observador na coloração de Gram para avaliar se o microrganismo apresenta Gram-labilidade ou se a “pseudo-Gram-labilidade” está relacionada a uma coloração mal-executada. Esta situação pode ser exemplificada na falha do momento da descoloração, quando os corantes das células Gram-negativas não são suficientemente removidos, sendo observadas, na microscopia, as células

eucarióticas e as bactérias Gram-negativas, ainda, com tonalidades de violeta (Figura 12).

#### VARIAÇÕES DA TÉCNICA DE GRAM

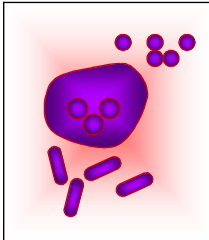
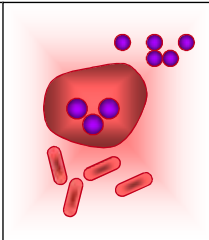
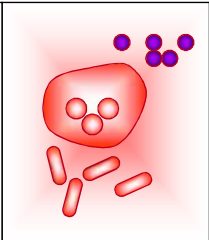
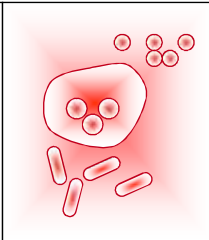
			
<p><b>POSSÍVEIS FALHAS:</b> PERMANÊNCIA MAIOR DO CRISTAL VIOLETA/LUGOL OU DESCOLORAÇÃO INSUFICIENTE COM ÁLCOOL</p>	<p><b>IDEAL</b></p>	<p><b>POSSÍVEIS FALHAS:</b> PERMANÊNCIA MENOR DO CRISTAL VIOLETA/LUGOL OU DESCOLORAÇÃO COM ÁLCOOL, MAIS QUE SUFICIENTE</p>	

Figura 12 – Variações que podem ocorrer na coloração de Gram, por falhas na execução. Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

Apesar de a maior parte das bactérias relacionadas com patologias humana e animal ser corada pelo Gram, e de esta ser a técnica mais difundida, ela não é absoluta, pois existem populações bacterianas refratárias a este tipo de coloração, por apresentarem constituintes diferenciados em suas paredes bacterianas, como as microbactérias, que não se coram ao Gram por possuírem ceras em sua parede, inviabilizando a penetração do cristal violeta. Além do mais, outras bactérias, em razão da pequena espessura de sua parede celular, não conseguem reter nem o corante nem o contracorante, como por exemplo as *Rickettsia sp.* e os espirilados dos gêneros *Treponema sp.* e *Leptospira sp.* Aqui deve ser ressaltado que bactérias que não possuem parede, como os micoplasmas também, não se coram ao Gram. Ademais, apesar da coloração de Gram não ser uma técnica eletiva para fungos, as leveduras do gênero *Candida sp.*, *Rodotorula sp.* e *Malassezia sp.* são coradas pelo cristal violeta, bem assim alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*, podem se apresentar com Gram-lábeis.

## Sensibilidade e especificidade

Os termos *sensibilidade e especificidade* costumam ser utilizados para descrever o desempenho e o valor dos testes diagnósticos. A sensibilidade de um teste refere-se à probabilidade de ser positivo na presença do patógeno. A especificidade do teste mede a probabilidade de fornecer um resultado negativo na ausência de um patógeno. A bacterioscopia pelo método de Gram varia com relação a sua sensibilidade e especificidade de acordo com o tipo de infecção e sítio anatômico. Para algumas infecções é um método muito específico e sensível, como é o caso da infecção uretral pelo gonococo de um paciente do sexo masculino. O achado de diplococos reniformes Gram-negativos de localização intra e extra-leucocitária no pus uretral é altamente específica de gonococos. O mesmo tipo morfológico observado em amostras de LCR indica quase sempre a presença de meningococos. Daur et al. (2004), determinaram a sensibilidade da coloração de Gram no diagnóstico prévio de infecções em sítios corporais estéreis. Analisaram 82 amostras de diferentes líquidos biológicos (líquido pleural, sinovial, ascético, pericárdico e peritoneal), comparando os resultados da coloração de Gram com o das culturas. A coloração de Gram apresentou sensibilidade e especificidade de 62,5% e 93,9% respectivamente. A baixa sensibilidade, ou seja, o crescimento em meios de cultura sem a visualização de bactérias na coloração prévia pelo Gram seria devido à baixa concentração de micro-organismos na amostra.

A bacterioscopia pelo método de Gram é bem mais complicada quando as amostras analisadas são provenientes de locais não-estéreis do organismo (secreção de oro faringe, escarro, fezes, lesões de pele) devido à presença da microbiota normal. É preciso ter muita experiência e conhecimento da hipótese diagnóstica e dados do paciente para a interpretação da coloração de Gram destes materiais.

## Importância clínico-laboratorial da coloração de Gram

Apesar dos vários avanços tecnológicos no diagnóstico bacteriológico, como por exemplo os métodos automatizados e as técnicas

da biologia molecular, a coloração de Gram permanece como um dos métodos mais valiosos para identificação bacteriana. Wu et al. (2013) compararam três métodos, PCR em tempo real, Coloração de Gram e cultura de líquido, e avaliaram a precisão destes testes no diagnóstico bacteriológico da meningite causada pelas bactérias mais frequentemente envolvidas (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae*). Embora a cultura seja considerada o padrão ouro, o PCR em tempo real e a coloração de Gram apresentaram maior precisão no diagnóstico. A vantagem da coloração de Gram em relação aos outros métodos é a rapidez e o baixo custo. Além disso, no paciente tomando antibióticos, o PCR em tempo real e a coloração de Gram são menos afetados que a cultura.

Outra vantagem da bacterioscopia pelo Gram é que os resultados dela podem fornecer muitas informações ao microbiologista e ao clínico em apenas 15 minutos após a chegada do espécime clínico ao laboratório, enquanto a cultura e até o PCR em tempo real requerem um tempo maior.

A importância clínico-laboratorial da coloração de Gram pode ser exemplificada ainda nos itens abaixo:

1. As propriedades de coloração e morfologia da bactéria encontrada no espécime clínico podem orientar os esforços na cultura e identificação da espécie (orienta a seleção dos meios de cultura adequados).

2. As propriedades de coloração e morfologia da bactéria encontrada no espécime clínico podem orientar a seleção empírica de antibióticos para o paciente.

3. A coloração de Gram pode ser utilizada para avaliar a qualidade da amostra clínica de qualquer material clínico sujeito à contaminação com a microbiota normal dos sítios anatômicos. Este procedimento é principalmente utilizado para amostras de escarro para cultura. A presença de células epiteliais escamosas em número  $\geq 25$  por campo de pequeno aumento (400x), mesmo com quantidade elevada de leucócitos

indica que a amostra foi contaminada com saliva ou secreção de orofaringe, contraindicando a realização da cultura.

4. A avaliação quantitativa e qualitativa dos outros elementos presentes no esfregaço corado pelo Gram, como leucócitos polimorfonucleares, células epiteliais, macrófagos etc., podem auxiliar na interpretação da resposta inflamatória.

5. Pode-se avaliar a quantidade de micro-organismos presentes na amostra para monitorar se o crescimento subsequente na cultura é compatível com o observado.

6. Pela rapidez do resultado, o teste se mostra muito importante em determinadas situações clínicas, como no diagnóstico de angina de Vincent, uma associação de anaeróbios que frequentemente é a causa de amigdalite purulenta que não pode ser diagnosticada por cultura.

7. A coloração de Gram de urina não centrifugada fornece uma avaliação aproximada do número de bactérias na urina. A presença ocasional de 1 bactéria por campo de grande aumento (1000x) sugere uma contagem de colônias  $\geq 10^5$ ufc/ml, enquanto que a presença constante de 1 bactéria por campo de grande aumento sugere uma contagem de  $\geq 10^6$ ufc/ml.

8. A pesquisa de patógenos entéricos específicos pela bacterioscopia corada pelo Gram de esfregaços de fezes diarreicas não é muito útil, devido à presença de microbiota extremamente variada. Entretanto, a avaliação pela coloração de Gram pode indicar se há predomínio ou ausência de um tipo bacteriano (ex.: presença de cocos Gram-positivos em grumos ou cachos ou ausência de bacilos Gram-negativos). A presença de grande quantidade de leucócitos geralmente indica processo infeccioso, e a visualização de pequenos bacilos Gram negativos curvos pode indicar a presença de *Campylobacter* spp. A presença de leveduras não costuma ter significado clínico, exceto para indicar que um aumento excessivo de leveduras pode indicar um desequilíbrio da microbiota intestinal e sua interpretação deve ser cuidadosa.

Outras características diferenciais relacionadas à coloração de Gram estão expostas no quadro abaixo:

**Quadro 1: Algumas características diferenciais entre bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas**

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
Muito sensíveis à ação bacteriostática dos corantes do grupo das trifenilmetanas (ex.: violeta de genciana)	Pouco sensíveis à ação bacteriostática dos corantes do grupo das trifenilmetanas
Muito sensíveis aos detergentes aniônicos	Pouco sensíveis aos detergentes aniônicos
Muito sensíveis às sulfas e penicilinas	Pouco ou insensíveis às sulfas e penicilinas
Baixa sensibilidade a estreptomomicina, cloranfenicol e tetraciclina	Alta sensibilidade a estreptomomicina, cloranfenicol e tetraciclina
Algumas espécies podem ser ácido-resistentes	Nunca são ácido-resistentes
Alta resistência ao dessecamento	Baixa resistência ao dessecamento
Alta resistência à ruptura física	Baixa resistência à ruptura física
Alta sensibilidade à ruptura da parede pela lisozima	Baixa sensibilidade à ruptura da parede pela lisozima

Fonte: adaptado de Bier, O., 1980; Tortora, 2000.

Na bacterioscopia pela coloração de Gram, tem sido preconizada não apenas uma análise quantitativa mas também qualitativa das bactérias e células encontradas no esfregaço de material clínico examinado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza a seguinte leitura:

Relatar células epiteliais, leucócitos e micro-organismos de forma numérica ou qualitativa observando o esfregaço em imersão 1000x(10x ocular e objetiva 100x):

• Numérica:

1+ – < 1 por campo

2+ – 1 por campo

3+ – 2-10 por campo

4+ – predomínio ou >10 por campo



- Qualitativa

Raros – <1 por campo

Poucos – 1 a 5 por campo

Moderados – 5 a 10 por campo

Abundantes – > de 10 por campo

## Diferentes técnicas de coloração de Gram

Durante os mais de 100 anos passados após a descrição da coloração por C. Gram, variações no procedimento com relação aos corantes utilizados, tempo de execução da coloração, substâncias utilizadas como descorantes, lavagem com água em dadas etapas, foram propostas. As mais utilizadas em bacteriologia são as descritas a seguir:

Coloração clássica de Gram segundo Bier (1980).

### *Reagentes*

#### Cristal violeta fenicada

- Cristal Violeta .....1g
- Álcool a 95° .....10ml
- Fenol fundido.....2g
- Água destilada .....100ml

#### Lugol

- Iodo metálico .....1g
- Iodeto de potássio .....2g
- Água destilada.....300ml

#### Fucsina Básica

- Fucsina básica.....01 ou 0,2g
- Água destilada.....100ml

### *Técnica de coloração:*

- 1) Cobrir o esfregaço por 1 minuto com solução fenicada de cristal violeta;
- 2) Escorrer o corante e cobrir o esfregaço durante 1 minuto com solução de lugol fraco;
- 3) Lavar em água corrente;
- 4) Descorar com álcool 95°GL até o decolorante fluir límpido;
- 5) Cobrir o esfregaço com solução de fucsina básica por 30 segundos.

Outra modificação utilizada é a coloração de Hucker (1921), que segundo alguns autores permite uma melhor visualização das bactérias.

### *Reagentes*

#### Cristal violeta

##### Solução A

- Violeta de metila .....2g
- Álcool etílico .....100ml
- Álcool metílico .....100ml

##### Solução B

- Oxalato de amônio.....4g
- Água destilada .....400ml

Misturar as soluções A e B. Deixar em repouso à temperatura ambiente por 24h ao abrigo da luz. Filtrar antes de usar e estocar em frasco escuro.

#### Lugol

- Iodo metálico ..... 3g
- Iodeto de potássio .....4,5g
- Água destilada.....450ml

#### Safranina

- Safranina.....2,5g
- Água destilada .....500ml

### *Técnica de coloração:*

- 1) Cobrir o esfregaço por 15 segundos com violeta de metila;
- 2) Adicionar igual quantidade de água sobre a lâmina e deixar agir por mais 45 segundos;
- 3) Escorrer o corante e lavar em água corrente;
- 4) Cobrir a lâmina com solução de lugol diluído (1/20) e deixar agir por aproximadamente 1 minuto;
- 5) Escorrer o lugol e lavar em água corrente;
- 6) Descorar com álcool até o descorante fluir límpido;
- 7) Lavar em água corrente;
- 8) Cobrir o esfregaço com safranina e deixar agir por 30 segundos;
- 9) Lavar em água corrente.

A modificação de Kopeloff foi recomendada para melhor visualização e diferenciação de bactérias anaeróbias que são facilmente descoradas.

### *Reagentes*

#### Cristal violeta alcalino

##### Solução A

- Cristal Violeta .....10g
- Água destilada .....1000ml

##### Solução B

- Bicarbonato de sódio.....50g
- Água destilada .....1000ml

##### Solução de iodo

- Hidróxido de sódio.....4g
- Cristais de iodo.....20g
- Iodeto de potássio.....1g
- Água destilada.....1000ml

#### Descorante

- Álcool 95%.....700ml
- Acetona.....300ml

#### Safranina

- Safranina.....20g
- Etanol 95% .....100ml
- Água destilada .....1000ml

### *Descorantes*

Uma grande variação na composição dos descorantes utilizados tem sido descrita. A maioria dos autores preconiza a utilização de álcool a 95% ou uma mistura de álcool-acetona em quantidades variáveis. O álcool proporciona uma descoloração mais lenta e à medida que se adiciona acetona, a velocidade de descoloração aumenta com a quantidade de acetona acrescentada.

### Controle de qualidade

Os reagentes devem ser examinados diariamente. Se a solução de cristal-violeta precipitar, deve-se refiltrá-la antes de usar. A evaporação pode afetar a eficácia dos reagentes. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam trocadas regularmente, dependendo da demanda. Diariamente, e quando novos reagentes forem preparados, corar, juntamente com os esfregaços da rotina, lâminas controles. Esfregaços de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) são preparados e fixados.

#### Resultados esperados:

- bacilos Gram-negativos, coloração rósea;
- cocos Gram-positivos, coloração violeta.

## Tamanho e forma das bactérias

A maioria das bactérias varia de 0,2 a 2,0 $\mu$ m de diâmetro e de 2 a 8 $\mu$ m de comprimento. Tradicionalmente são descritas três formas básicas das bactérias: coco (esférico), bacilo (em forma de bastão) e espirilo (Figura 13).

















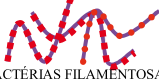

PRINCIPAIS TIPOS MORFOLÓGICOS BACTERIANOS		TIPOS DE ARRANJOS	
BÁSICOS	SECUNDÁRIOS		
 COCO GRAM NEGATIVO	 COCO GRAM NEGATIVO RENIFORME	 DIPLOCOCOS Ex. <i>Neisseria</i> sp.	 Ex. <i>Micrococcus</i> sp.
 COCO GRAM POSITIVO	 COCO GRAM POSITIVO LANCEOLADO	 ESTAFILOCOCO Ex. <i>Staphylococcus</i> sp.	 TÉTRADE Ex. <i>Gaffkya</i> sp.
 BACILO GRAM NEGATIVO	 BACILO GRAM NEGATIVO FUSIFORME	 ESTREPTOBACILO Ex. <i>Haemophilus ducreyi</i>	 PALIÇADA Ex. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
 BACILO GRAM POSITIVO	 BACILO GRAM POSITIVO LANCEOLADO	 SEM ARRANJO Ex. <i>Bacillus</i> sp.	 SEM ARRANJO Ex. Enterobactérias – <i>Proteus</i> sp.; <i>Escherichia</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.
 BACTÉRIAS FILAMENTOSAS GRAM LÁBEIS Ex. <i>Nocardia</i> sp.		SEM ARRANJO CARACTERÍSTICO	
 ESPIRIDADOS (NÃO SE CORAM AO GRAM) Ex. <i>Treponema</i> sp.; <i>Borrelia</i> sp.		SEM ARRANJO CARACTERÍSTICO	

Figura 13 – Desenho das formas e arranjos bacterianos.

Fonte: Prof. José Julio Costa Sidrim.

Os cocos são redondos, mas podem se apresentar ovais ou achatados. Dependendo do plano de divisão celular, as células bacterianas podem permanecer unidas umas às outras. Os cocos que permanecem em pares são chamados diplococos. Aqueles que após a divisão permanecem ligados em forma de cadeia são chamados estreptococos. Os que se dividem em dois planos e permanecem em grupos de quatro são chamados tétrades. Os que se dividem em três planos e permanecem unidos em forma de cubo, com oito bactérias, são chamados sarcinas. Por último os que se dividem em múltiplos planos e permanecem agregados em formações que lembram cachos de uva são chamados de estafilococos.

Os bacilos se dividem ao longo de seu eixo curto; assim existem menos agrupamentos de bacilos que de cocos. A maioria se apresenta isolados. Alguns possuem extremidades afiladas e outros apresentam extremidades cortadas em ângulo reto. Outros são ovalados e parecidos com cocos e recebem o nome de cocobacilos. As bactérias espiraladas possuem uma ou mais curvaturas. As que parecem uma vírgula são chamadas de vibriões. Outras possuem forma helicoidal, como um saca-rolhas, e são chamadas espirilos.

A morfologia bacteriana não se restringe a apenas estas três formas básicas: cocos, bacilos e espirilos. Na verdade os procariotos apresentam uma grande variedade de tamanho, formatos e arranjos. Têm sido descritas células bacterianas que apresentam forma que lembra limão, forma de chama de vela, forma de grão de feijão, forma de Y (forma bifida), forma retangular (ângulo reto, extremidade arredondada, fusiforme, filamentosa), forma de lágrima, triangular, curvas, afiladas e outras.

Outra questão importante é que muitas bactérias podem apresentar mais de uma forma. Como exemplo temos o *Helicobacter pylori* que pode se apresentar na forma helicoidal (asa de gaivota) (Figura 14), forma de bacilo (nos tecidos) e forma cocoide (em subcultivos); a *Escherichia coli* uropatogênica, nas formas de bacilo, coco e forma filamentosa; e a *Legionella pneumophila*, que pode se apresentar sob 8 diferentes formas (5 *in vivo*). Ainda, a forma, embora seja uma característica que parece ser determinada pela hereditariedade, é também uma característica fisiológica e que pode mudar de acordo com o meio onde

a bactéria se encontra e com os desafios que enfrenta. Como exemplo é citada a *Salmonella typhimurium*, bacilo, que apresenta células maiores em meios ricos e células menores em meios mínimos.

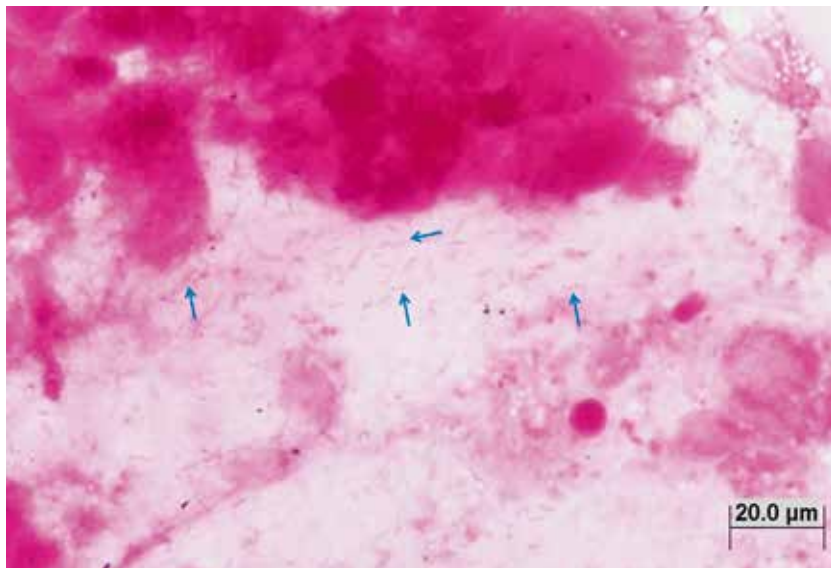


Figura 14 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de biópsia gástrica. Numerosas bactérias Gram-negativas espiraladas em forma de “asa de gaivota” (seta azul).

Fonte: próprio autor.

A *Escherichia coli* assume forma filamentosa quando em meio mínimo; a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta a forma de bacilo curto (meio líquido) e filamentosa em meio mínimo; *Actinomyces israeli* na ausência de cisteína e fosfato, assume forma ramificada e forma de bacilo quando em meio rico. As espécies do gênero *Clostridium* apresentam bacilos em processo de esporulação ou esporos soltos quando em ambiente sem nutrientes.

Segundo Lorian (1986), formas bacterianas “anormais” são frequentemente encontradas em bacterioscopia pelo Gram de espécimes clínicos. Cerca de 1/3 das culturas processadas em laboratórios de hospitais são provenientes de pacientes fazendo uso de antimicrobianos. Concentrações subinibitórias de antibióticos podem ser detectadas na corrente circulatória ou nos tecidos do paciente em vários momentos da

terapêutica antibiótica e as bactérias sob a ação dessas concentrações subinibitórias apresentam formas alteradas. Bacilos Gram-negativos apresentando formas filamentosas longas são as formas bacterianas mais frequentemente encontradas nas bacterioscopias.

## Microbiota normal humana

Os primeiros estudos científicos sobre micro-organismos e suas interações com o hospedeiro humano ocorreram na segunda metade do século XIX. Pasteur (final do século XIX) afirmou que “Os micróbios são necessários para a vida normal”. Metchnikoff (1908) também afirmou que “A composição da flora é essencial para o bem estar do hospedeiro e é importante entender as interações entre hospedeiro e bactérias”. Em 1855, o pediatra e bacteriologista alemão Theodor Escherich (1857-1911) descreveu a microbiota e em 1866 descreveu a colonização do trato gastrointestinal (TGI) infantil sugerindo o efeito benéfico de certas bactérias na digestão. Ele afirmou que “O conhecimento aprofundado da flora endógena é essencial não somente para a compreensão da fisiologia da digestão como também para a compreensão da patologia e terapia das doenças microbianas intestinais”. Publicou o artigo “The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant” na *Forschritte der Medizin* 3, 1888.

Porém foi o obstetra alemão Alfred Döderlein (1860-1941) o primeiro cientista a sugerir a associação benéfica das bactérias vaginais pela produção de ácido láctico a partir de açúcares, prevenindo ou inibindo o crescimento de bactérias patogênicas. As bactérias do gênero *Lactobacillus*, que formam a flora vaginal normal, são designadas como bacilos de Döderlein.

A associação benéfica de bactérias produtoras de ácido láctico e o hospedeiro humano têm sido sugerida por muitos pesquisadores. Destas bactérias fazem parte as bifidobactérias, descobertas em 1889, e descritas no início dos anos 1900 como sendo tipicamente associada com as fezes, especialmente de crianças alimentadas do leite materno.

O corpo humano alberga mais bactérias que células eucarióticas numa proporção de cerca de mais de 10 vezes (o corpo humano contém



cerca de  $1 \times 10^{13}$  células corporais e abriga cerca de  $1 \times 10^{14}$  células bacterianas). Estas bactérias são denominadas coletivamente de microbiota. Esta microbiota é adquirida pelo recém-nascido no momento do parto e a colonização vai ocorrendo gradativamente até quando a criança atinge 2 a 3 anos de idade e a microbiota passa a se assemelhar, qualitativamente e quantitativamente, com a microbiota do indivíduo adulto. Diferentes sítios anatômicos albergam diferentes tipos de bactérias. Mesmo um sítio anatômico único como a boca, contém diferentes locais (sulco gengival, dente, saliva, língua) que são colonizados por diferentes bactérias. Os sítios normalmente colonizados são: pele, fossas nasais e orofaringe, boca, intestino grosso, trato genital feminino, uretra distal, conjuntiva ocular.

Algumas características são comuns aos sítios colonizados:

1. Os micro-organismos numericamente predominantes são bactérias. Os Archae e fungos podem ser encontrados, mas em menor número.
2. A maioria das bactérias são Gram-positivas. Todavia a razão das bactérias Gram-positivas dominarem a microbiota normal humana ainda não está respondida.
3. Embora a microbiota de diferentes sítios colonizados exerça uma ação protetora, algumas destas bactérias podem causar severas infecções se penetrarem nos sítios estéreis.

## Microbiota predominante nos sítios colonizados

**Pele** – a superfície da pele é seca, ligeiramente ácida e o ambiente é de aerobiose. Bactérias Gram-positivas como corinebactérias (difteroides) e estafilococos estão presentes com predominância do *Staphylococcus epidermidis*. Os difteroides são bacilos Gram-positivos pleomórficos e que podem se apresentar em agrupamentos em forma de V ou Y (Figura 15). Nos folículos pilosos podem também ser encontradas bactérias anaeróbias como *Propionibacterium acnes*.

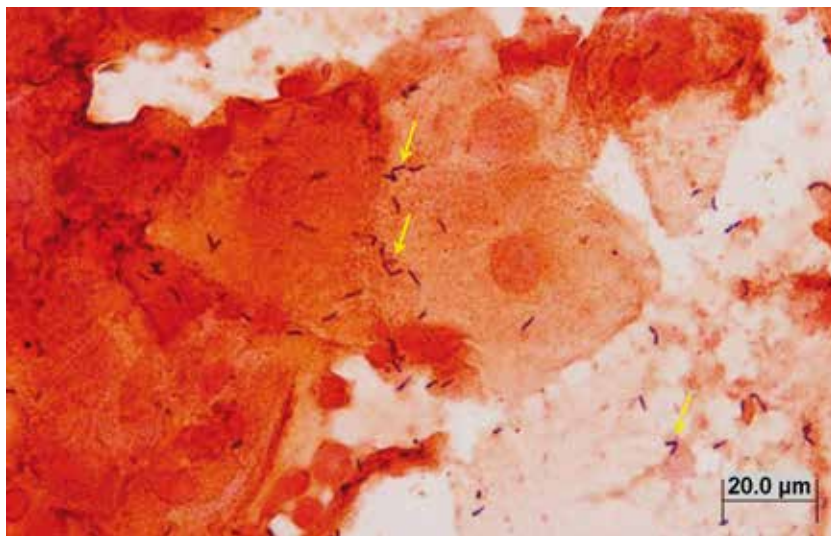


Figura 15 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de secreção vaginal. Bacilos curtos Gram positivos apresentando arranjo em V, lembrando letras chinesas (seta amarela). Fonte: próprio autor.

**Nasofaringe e orofaringe** – Na nasofaringe é comum a colonização por cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* (1/3 da população é colonizada) e *Streptococcus pneumoniae*). Aproximadamente 25% a 40% de indivíduos adultos e crianças saudáveis podem ser colonizados por *S. pneumoniae* em alguma fase de sua vida. A microbiota da boca e orofaringe é constituída predominantemente por cocos Gram-positivos (estreptococos).

**Intestino grosso** – o intestino grosso se caracteriza por um fluxo lento dos alimentos. É o sítio anatômico com maior diversidade bacteriana e maior número de bactérias (cerca de  $10^{12}$  bactérias/g de fezes). É um ambiente anaeróbico e, portanto, as bactérias anaeróbias predominam neste sítio. As bactérias anaeróbias numericamente predominantes são as do gênero *Bacteroides* spp (Bacilos Gram-negativos) e um grande número de espécies Gram-positivas ( muitas ainda não caracterizadas). Populações numericamente inferiores contém as enterobactérias e enterococos.

**Trato genital feminino** – A microbiota vaginal normal apresenta um total de  $10^8$  a  $10^9$  de colônias bacterianas por mililitro de secreção

vaginal, sendo que a concentração de espécies aeróbias e anaeróbias varia em diferentes momentos do ciclo menstrual. É unânime e aceito que a microbiota vaginal normal de uma pessoa adulta consiste predominantemente de *Lactobacillus* spp. Estes lactobacilos são bactérias fermentadoras que produzem ácido láctico, o qual provavelmente contribui para o pH ácido da vagina (5.0). Este pH baixo parece atuar como uma barreira protetora contra a colonização por bactérias patogênicas. Outra possível contribuição dos lactobacilos na proteção deste sítio anatômico é o fato de algumas cepas produzirem peróxido de hidrogênio que é tóxico para muitos micro-organismos.

### Bacterioscopia de sítios estéreis

Diversos são os líquidos corporais provenientes de sítios anatômicos estéreis que podem ser recebidos no laboratório para realização de bacterioscopias. São eles: líquido pleural, pericárdico, peritoneal, sinovial e líquido amniótico. Como é de sítio estéril, é provável que a bactéria descrita, quando encontrada, seja a causadora do processo infeccioso. Geralmente em sítios estéreis só são visualizados um tipo de bactéria. Na figura 16 podem ser observadas bactérias Gram-positivas, em forma de chama de vela e aos pares.

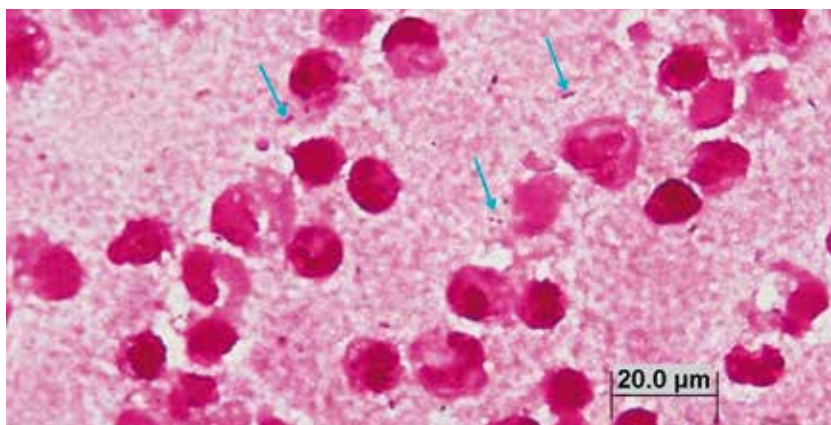


Figura 16 – Coloração de Gram (1000x).Esfregaço de líquido pleural. Grande quantidade de células (polimorfonucleares) e pequena quantidade de diplococos Gram-positivos (seta azul).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Células (polimorfonucleares) também são observadas no esfregaço. Diplococos Gram-positivos lanceolados sugerem *Streptococcus pneumoniae*, importante agente etiológico de pneumonias e derrame pleural. O número de bactérias encontrado nos esfregaços geralmente é muito pequeno. Entretanto, na cultura, muitas vezes, é obtido o crescimento bacteriano.

## Bacterioscopia de sítios com microbiota normal

### Secreções purulentas

Quando fazemos uma bacterioscopia de secreções purulentas (pele – abscessos fechados ou não), às vezes torna-se difícil a observação de leucócitos íntegros devido ao estado de degeneração celular. Uma observação em vários campos microscópicos faz-se necessária para visualizarmos presença de restos celulares sugestivos de material leucocitário. Os estafilococos são as principais bactérias responsáveis por infecções fechadas como foliculites, abscessos. Na figura 17 podem ser observados cocos Gram-positivos agrupados que sugerem este gênero bacteriano.

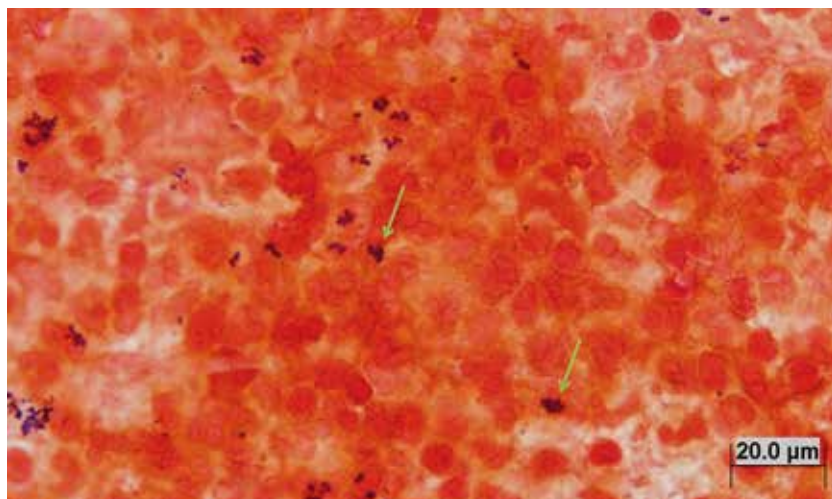


Figura 17 – Coloração de Gram(1000x). Secreção purulenta. Cocos Gram-positivos agrupados. Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro gênero bacteriano importante em lesões de pele (impetigos) são os estreptococos (Figura 18).

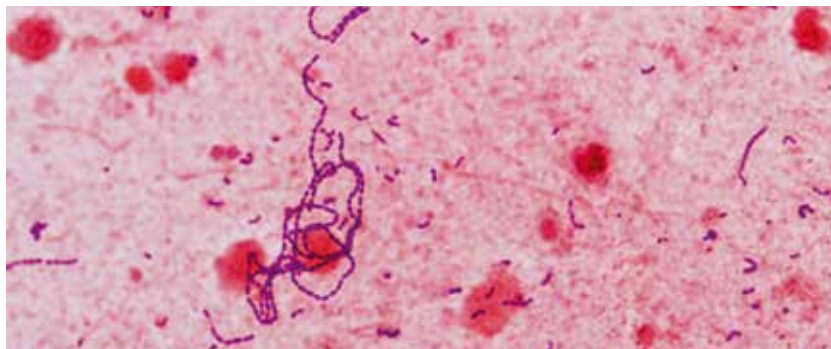


Figura 18 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de escarro. Cocos Gram-positivos dispostos em longas cadeias. Também são visualizados cocos Gram-positivos isolados e em pequenas cadeias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Fezes

A microbiota do intestino é extremamente variada e numerosa e a avaliação da bacterioscopia de fezes pelo Gram deve se deter no predomínio ou no equilíbrio entre as formas bacterianas observadas. Células polimorfonucleares leucócitos, se visualizados, sugerem processo inflamatório. Na figura 19 pode ser observada uma bacterioscopia de fezes normal; observar a presença de numerosas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

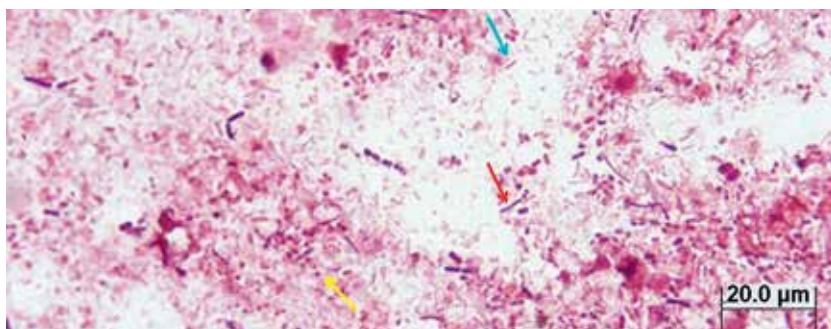


Figura 19 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de Fezes. Pode ser observado uma grande e diversificada quantidade de bactérias (Bacilos Gram-negativos, bacilos Gram-positivos, cocos Gram positivos).

Fonte: Elaborada pelo autor.



## Secreção vaginal

A microbiota vaginal normal apresenta células de descamação, raros leucócitos e predominância de bacilos Gram-positivos (bacilos de Döderlein) (Figura 20).

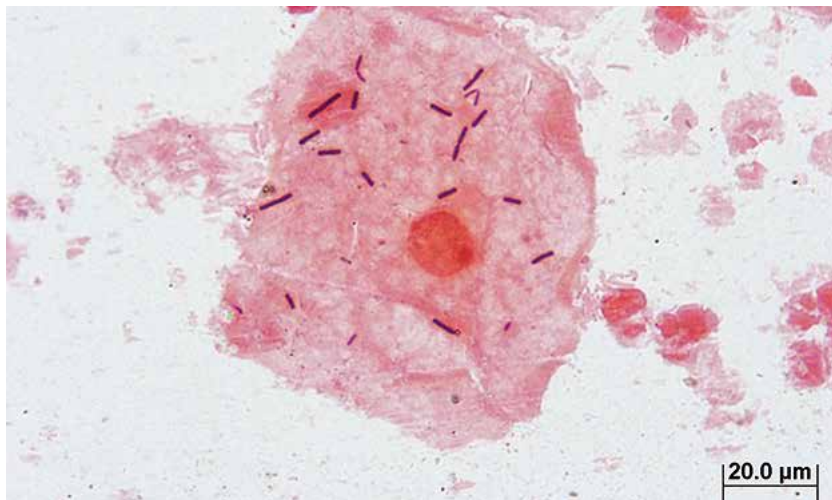


Figura 20 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de secreção vaginal. Célula epitelial e bacilos Gram-positivos (Bacilos de Doederlein).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A coloração de Gram é útil para o diagnóstico de vaginose bacteriana e candidíase vaginal. A vaginose bacteriana (VB) é um distúrbio do ecossistema vaginal de etiologia polimicrobiana, em que há predomínio de micro-organismos anaeróbios. É a mais frequente causa de corrimento genital, responsável por 40 a 50% dos casos, sendo que cerca de metade das mulheres portadoras são assintomáticas. No diagnóstico da vaginose bacteriana, através da coloração de Gram, pode ser observado um grande número de bacilos Gram-negativos pleomórficos, bacilos finos e curvos ou cocobacilos. Estas bactérias depositam-se sobre as células epiteliais conferindo um aspecto arenoso. Podem ser observadas também células escamosas cobertas em sua superfície por cocobacilos pleomórficos Gram-variáveis, caracterizando as chamadas *clue-cells* ou “células chave” (Figura 21).

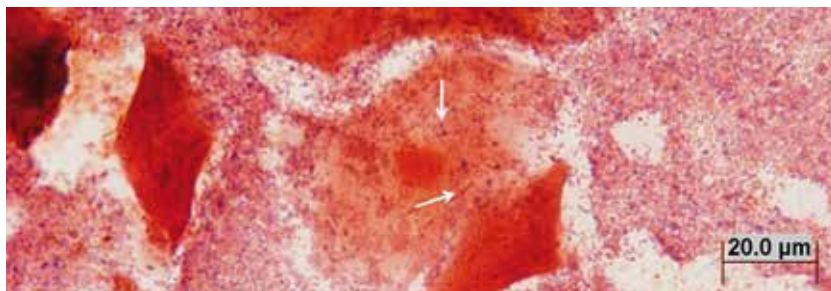


Figura 21 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de secreção vaginal. “Clue cells”.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Estas células estão geralmente presentes nas infecções causadas por *Gardnerella vaginalis*. O diagnóstico de vaginose bacteriana pode ser realizado utilizando-se o critério de Nugent que tem apresentado especificidade de 83% e sensibilidade de 89% quando comparado com os sinais clínicos, embora seja pouco utilizado na prática clínica, por requerer mais tempo para sua realização e um profissional treinado na leitura das lâminas. O escore avalia o número de *Lactobacillus* (bacilos Gram-positivos, grandes) somado ao de *Gardnerella* (organismos cocobacilares Gram-negativos) e ao de *Mobiluncus* (bacilos curvos, finos, Gram-variáveis). O achado, no exame do esfregaço de secreção vaginal corado pelo Gram, de blastosporos e ou pseudo-hifas de leveduras sugere candidíase vaginal (Figura 22).

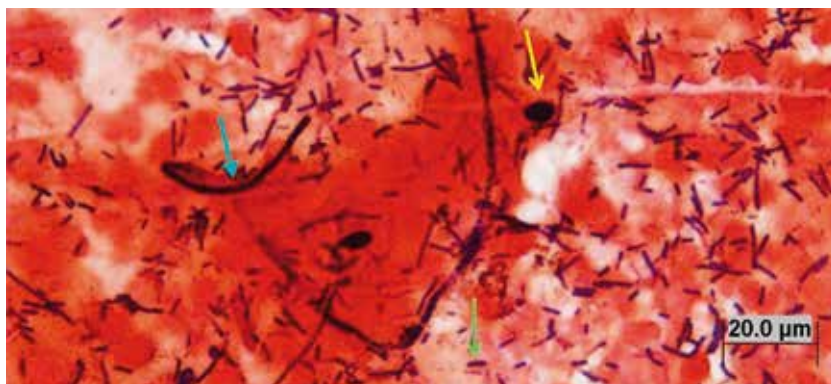


Figura 22 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de secreção vaginal. Presença de bacilos Gram-positivos e pseudo-hifas de leveduras.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## Secreção uretral

Tratando-se de um paciente do sexo masculino, a bacterioscopia de secreção uretral com o achado da figura 23 fornece um diagnóstico presuntivo (e quase de certeza) de infecção gonocócica; observar a presença de diplococos Gram-negativos intra-leucocitários.

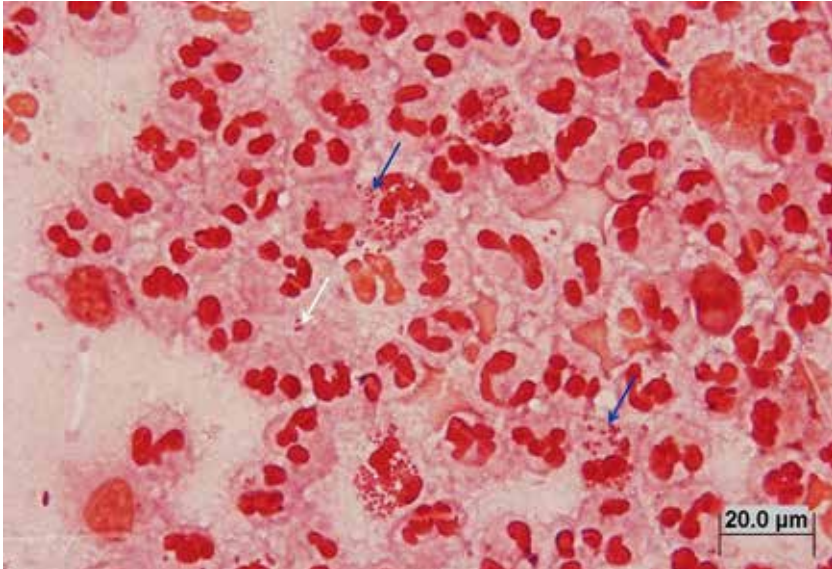


Figura 23 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de secreção uretral. Presença de grande quantidade de células polimorfonucleares. Presença de diplococos Gram-negativos de localização intra e extra-leucocitários.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Urina

A infecção sintomática do trato urinário (ITU) situa-se entre as mais frequentes infecções bacterianas do ser humano, figurando como a segunda infecção mais comum na população em geral, predominando entre os adultos em pacientes do sexo feminino. Os micro-organismos mais frequentemente envolvidos nas ITU incluem bactérias da família *Enterobacteriaceae*. O agente causal de ITU mais frequente é a *Escherichia coli*, a qual está associada aproximadamente a 80% de



todas as ITUs ambulatoriais, sendo também responsável por uma grande porcentagem de infecções urinárias em pacientes hospitalizados. A presença de um ou mais micro-organismos por campo de imersão (1000x) na coloração de Gram de uma gota de urina não centrifugada correlaciona-se com um cultivo de mais de  $10^5$ ufc/ml. Na figura 24, é mostrada bacterioscopia pelo Gram de bactérias Gram-negativas isoladas de urina (bacterioscopia feita a partir de culturas *in vitro*); observar as diferentes características dos bacilos. Em B, apresenta-se um bacilo Gram-negativo pálido. Em D cocobacilos e bacilos fusiformes Gram-negativos.

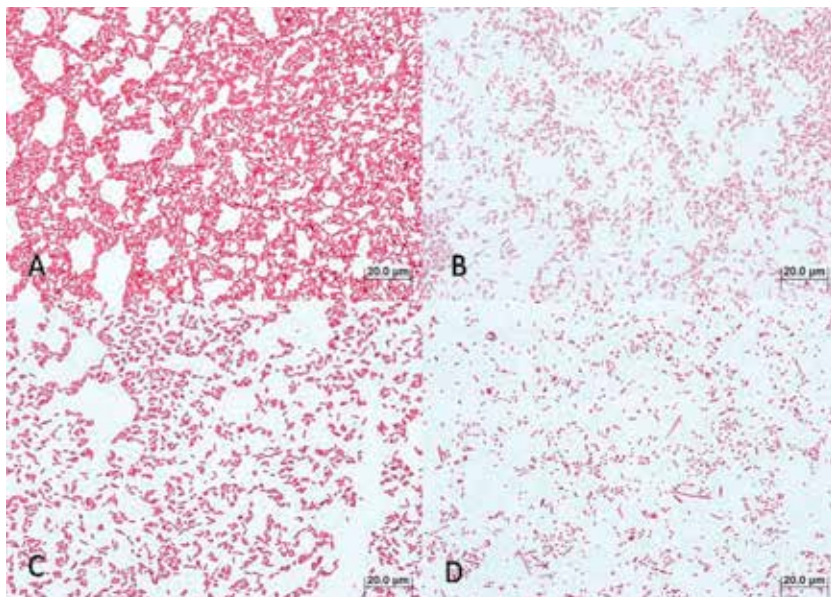


Figura 24 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço realizado a partir de crescimento bacteriano em meios de cultura líquidos. São observados bacilos Gram-negativos de tamanho e formas variados (A e C). Em B, observa-se um bacilo Gram-negativo pálido. Em D cocobacilos e bacilos fusiformes Gram-negativos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Escarro

Quando o material clínico é escarro de paciente e com solicitação médica de bacterioscopia é preconizada uma avaliação quantitativa dos

elementos (células e bactérias) presentes no escarro para validação do material. O critério mais frequentemente utilizado é:

Amostras adequadas:  $\leq 10$  células epiteliais/campo e  $\geq 25$  polimorfonucleares/campo

Amostras inadequadas:  $> 10$  células epiteliais/campo e  $< 25$  leucócitos/campo

Na bacterioscopia do escarro da figura 25, pode ser observado um esfregaço de escarro corado pela técnica de Gram apresentando grande quantidade de bactérias (bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos) e células.

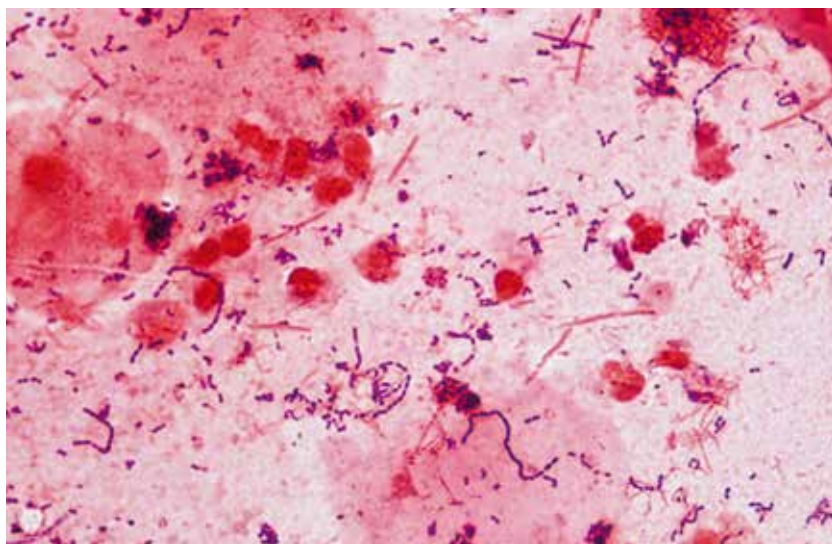


Figura 25 – Coloração de Gram . Esfregaço de escarro. Microbiota mista contendo cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um achado pouco frequente pode ser visualizado na figura 26, onde foram encontradas lavas de *Strongiloides*; um achado incomum mas que pode ocorrer quando o paciente está com infestação maciça, e durante o ciclo pulmonar do helminto.

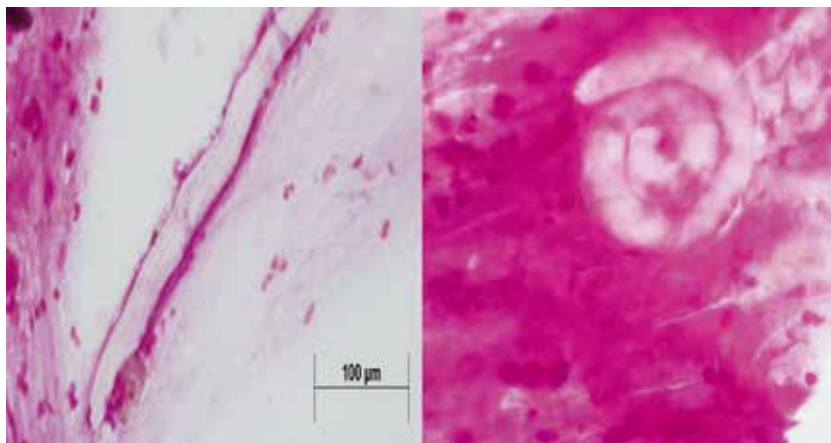


Figura 26 – Coloração de Gram (1000x). Esfregaço de escarro. Presença de larva de helminto (*Strongiloides* spp).

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Coloração de Ziehl-Neelsen

### Introdução

Pertencente ao gênero *Mycobacterium*, o Bacilo de Koch (BK) ou *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito em 1882 por Robert Koch e foi nomeado em sua homenagem.

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e outras microbactérias denominadas não causadoras de tuberculose (MNT). O complexo *M. tuberculosis* é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose (TB) humana; *M. bovis*, que causa doença em bovinos, no homem e em vários outros mamíferos; *M. africanum*, agente etiológico da TB humana encontrado mais frequentemente na África; e *M. microti* patogênica para roedores. Recentemente, foram incluídas nesse complexo *M. caprae*, que causa infecção em caprinos, e *M. pinnipedii*, que causa infecções em leões marinhos e no homem. “*M. canettii*”, uma variante de *M. tuberculosis*, ainda não foi oficialmente reconhecida como uma espécie do complexo. Essas espécies são muito similares e apresentam

99,9% de identidade genética, no entanto, apresentam diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade.

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa por aerossóis produzidos durante a expectoração. Entre as principais características do BK estão: forma de bacilo, não esporulado e não encapsulado além de álcool-ácido resistente (BAAR). Além dessas características morfológicas, pode-se citar também que o BK é intracelular facultativo, aeróbico estrito e é o agente etiológico da tuberculose, tendo o pulmão como principal localização no organismo. Por ser álcool-ácido resistente, o BK retém o corante após lavagem com álcool e ácido e, assim, pode ser visualizado ao se adicionar a coloração de contraste. Dificilmente ele pode ser corado pelo método de Gram, pois sua parede é constituída principalmente por ácidos micólicos que formam uma barreira hidrofóbica que impossibilita esse tipo coloração e confere resistência à descoloração por álcool-ácido, dessecação e a alguns agentes químicos.

Por meio da técnica de Ziehl-Neelsen, pode-se visualizar o bacilo álcool-ácido resistente, o que auxilia no diagnóstico da tuberculose. Esse exame é chamado de Baciloscopia e oferece um diagnóstico presuntivo, sendo a cultura o padrão ouro e que fornece o diagnóstico de certeza. O número de micobactérias na amostra é importante para a análise da evolução da doença. Além dessas características, os bacilos também podem formar agrupamento em corda.

## Técnica de Ziehl-Neelsen

Foi desenvolvida pelo bacteriologista Franz Ziehl e pelo patologista alemão Friedrich Neelsen em 1882. Permite a visualização de bactérias que apresentam lipídeos, como ácido micólicos, fortemente ligados à parede celular, ou seja, têm uma parede celular bastante hidrofóbica, o que dificulta a penetração de corantes aquosos. As bactérias observadas por esse método são do gênero *Mycobacterium* e *Nocardia*. Uma importante característica desse método é o fato de ele ser uma coloração a quente.

Nesse método, inicialmente, utiliza-se o corante fucsina de Ziehl para corar as bactérias. Após essa coloração inicial, é usada uma solução

de álcool-ácido. Essa solução não consegue penetrar na parede hidrofóbica das bactérias desses gêneros, as quais são, por essa razão, chamadas de álcool-ácido resistentes (BAAR). Por outro lado, outras bactérias não resistem a essa solução e são descoloridas, tomando a cor do corante de fundo. Normalmente, esse corante de fundo tem como objetivo apenas permitir o contraste, podendo ser utilizado para isso o corante azul de metileno, por exemplo. A técnica pode ser realizada como descrita abaixo:

- 1) Cobrir o esfregaço (homogêneo, delgado e fixado) com solução de fucsina de Ziehl.
- 2) Deixar agir por 5 a 10 minutos, aquecendo em chama branda até o desprendimento de vapores.
- 3) Lavar com água corrente e descorar com solução de álcool-ácido clorídrico a 1%. Lavar com água corrente.
- 4) Cobrir o esfregaço com azul de metileno e deixar por um minuto.
- 5) Lavar com água corrente e deixar secar.
- 6) Visualizar com objetiva de imersão (100x).

Na coloração pelo método de Ziehl- Neelsen, os bacilos aparecem em forma de bastão avermelhados, por vezes isolados ou agrupados ou ainda fragmentados (pacientes em tratamento), com um fundo azul (Figura 27).

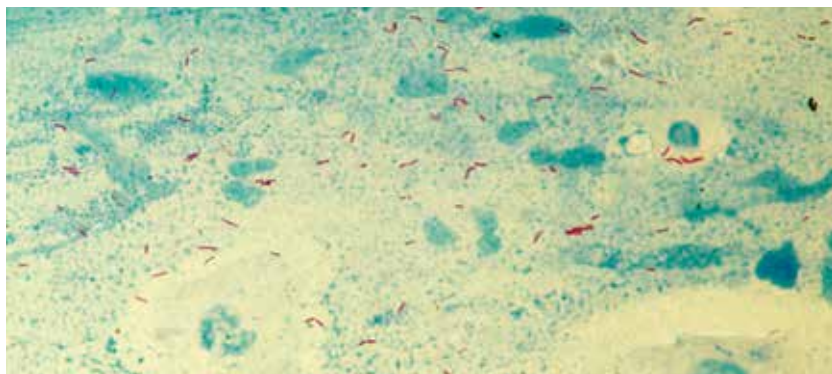


Fig. 27– Coloração de Ziehl-Neelsen (1000x). Esfregaço de escarro. Presença de BAAR (em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Nota Clínica

A tuberculose, de acordo com o Ministério da Saúde, é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK). Estima-se que a contaminação se dá de 1:10 (um doente pode contaminar até 10 indivíduos sadios). Um terço da população mundial está infectada, mas a maioria está sob a forma latente; porém, se houver um comprometimento da imunidade, a doença começa a manifestar sinais e sintomas.

Segundo o Ministério da Saúde, os principais fatores de risco são o contato com pessoas doentes, aglomerações, desnutrição, alcoolismo/dependência química, condições socioeconômicas precárias, exposição profissional a doenças e condições imunossupressoras (AIDS, linfoma ou uso de corticoides).

O homem doente é o reservatório do BK e sua transmissão ocorre de pessoa para pessoa por meio de gotículas de saliva expelidas por espirros, tosse ou pela fala, dessa forma as vias aéreas superiores constituem a porta de entrada do bacilo no organismo humano. O período de incubação da doença varia de 4 a 12 semanas (BRASIL, 2013b).

A tuberculose pode manifestar-se de duas formas: a pulmonar e a extrapulmonar (meninges, gânglios, ossos e articulações, vias urinárias, pele e trato gastrointestinal, principalmente intestinos). As formas extrapulmonares atingem principalmente crianças e indivíduos imunodeprimidos (BRASIL, 2002).

O diagnóstico, segundo o MS, se dá pelos sinais e sintomas que esses pacientes apresentam. As principais manifestações são tosse persistente por mais de quatro semanas, febre vespertina, emagrecimento, falta de apetite e sudorese noturna. Também podem ser realizados exames complementares como Raio X e a pesquisa do bacilo no escarro (baciloscopia).

A baciloscopia deve ser realizada preferencialmente em jejum e pela manhã, sendo coletadas três amostras de escarro em três dias consecutivos. Depois de coletada a amostra, ela vai ser analisada por um microbiologista que realizará a contagem de bacilos por campo (figura 2/ quadro 1). É importante salientar que a baciloscopia só revela a quantidade de bacilos. Para sabermos qual o agente causador, é necessária a realização de

cultura do agente causador, pois é possível a ocorrência de infecção por outras micobactérias ou do gênero *Nocardia* (BRASIL, 2010).

A cura é bem mais rápida quando o diagnóstico e o tratamento são realizados precocemente. O tratamento demora um pouco podendo variar de 6 a 12 meses e requer associações de drogas que podem causar reações indesejáveis.

A baciloscopia é a pesquisa de BAAR no esfregaço da amostra através do microscópio. Trata-se de uma técnica simples de fácil execução, porém de baixa sensibilidade (25 a 65%) se comparado com a cultura, pois o número mínimo de bacilos para que se tenha um resultado positivo de baciloscopia varia de 5000 a 10.000 bacilos/ml da amostra.

Na coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, o resultado é quantitativo, o que permite a avaliação da infectividade/potencial de transmissibilidade do paciente bem como acompanhar a redução da transmissibilidade após o início da terapêutica.

São lidos 100 campos microscópicos e o resultado é como descrito abaixo.

#### *Resultado Negativo*

- Não foram encontrados BAAR em 100 campos observados.

#### *Resultado Positivo +*

- Presença de menos de 1 BAAR por campo em 100 campos examinados.

#### *Resultado Positivo ++*

- Presença de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos examinados.

#### *Resultado positivo +++*

- Presença de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos examinados.

Classificação da Baciloscopia de acordo com ANVISA.

## BIBLIOGRAFIA

BECK, Raymond W. *A chronology of microbiology in historical context*. Washington DC: American Society for Microbiology, 2000.

BIER O. *Bacteriologia e Imunologia*. 20. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1980.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

\_\_\_\_\_. *Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde*. Módulo 7: Detecção e identificação de microbactérias de importância médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Pneumologia Sanitária. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. 6. ed. rev. e ampl. Brasília: Ministério da Saúde, Série A. Normas e Manuais Técnicos; n. 148, 62p, 2002.



BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 7: Detecção e identificação de micobactérias de importância médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 43p. 2013b

DAUR, A. V. et al. Sensibilidade da coloração de Gram no diagnóstico prévio das infecções em sítios corporais estéreis. *Visão Acadêmica*, Curitiba. v. 5, n. 2, p. 91- 94, 2004.

ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglings. *Fortschritte der Medizin* 3,515-522, 547-554, 1885. Em: Escherich, T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. Parts 1 and 2. [Translated by Bettelheim, K.A.] *Reviews of Infectious Diseases*, v. 10, p. 1220-1225, 1988.

FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. *NewsLab*, Novo Hamburgo, v. 82, p. 124-128, 2007.

HUCKER G. J. A. New Modification and Application of the Gram Stain. *J Bacteriol.*, v. 6, n. 4, p. 395-397, 1921.

LORIAN, V.; WALUSCHKA, A. Blood cultures showing aberrant forms of bacteria. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 57, p. 406-409, 1972.

LORIAN V. *Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, their virulence and susceptibility to immunodefenses*. Em: Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1986. p. 596-668.

METCHNIKOFF, Elie. *The prolongation of life: optimistic studies*. New York: G. P. Putnam's Sons, 1908. 343p.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

SCHAECHTER, M. et al. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

STINGHEN, A. E. M. et al. *Coloração de Gram: como fazer, interpretar e padronizar*. 2. ed. Curitiba: Microscience, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

VERMELHO, A. B. et al. *Práticas de microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

YOUNG, K. The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biol. Rev.*, v. 70, n. 3, p. 660-703, 2006.

WILSON, B. A. et al. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. 3. ed. Washington DC: ASM Press, 2011. p. 90-94.

WU, H. M, et al. Accuracy or real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infectious Diseases*, v.13, n. 26, 2013.

FONSECA, L. F. A. Estudo do líquido pleural: uma revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Salvador, v. 43, n. 3, p. 245-50, 2011.

TORTORA G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

PROBIÓTICOS prebióticos e simbióticos. *food ingredients Brasil*, v. 17, 2011. <Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/177.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2013.



## OS AUTORES

### **José Luciano Bezerra Moreira**

Médico, Doutor em Microbiologia e Imunologia Pela Universidade Federal de São Paulo, pós-doutor em Genética molecular e de micro-organismos na University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST, Inglaterra), Professor de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Membro Permanente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da UFC.

### **Cibele Barreto Mano de Carvalho**

Médica, Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Professora de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Membro Permanente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da UFC.

### **Cristiane Cunha Frota**

Farmacêutica, Doutora em Genética Molecular de Microorganismos pelo University College of London (Inglaterra), Professora de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Membro Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da UFC.



Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará - UFC  
Av. da Universidade, 2932 - fundos - Benfica  
Fone: (85) 3366.7485 / 7486  
CEP: 60020-181 - Fortaleza - Ceará

[imprensa.ufc@pradm.ufc.br](mailto:imprensa.ufc@pradm.ufc.br)

**A** Universidade Federal do Ceará vem contribuindo de modo decisivo para a educação e para a ciência em nosso país. Como um dos seus avanços acadêmicos, merece destaque o crescimento da pós-graduação, que desempenha papel fundamental na formação de recursos humanos.

A pós-graduação brasileira tem sido avaliada de forma sistemática nas últimas décadas. Nesse processo, o livro passou a ser incluído como parte importante da produção intelectual acadêmica, principalmente na área das Ciências Sociais e Humanas, divulgando os esforços dos pesquisadores que veiculam parte de sua produção nesse formato.

A Coleção de Estudos da Pós-Graduação foi criada visando apoiar os programas de pós-graduação *stricto sensu* da UFC a partir de uma política acadêmico-científica, viabilizando a publicação da produção intelectual em forma de livro.

Em 2014, segundo ano de sua criação, a Coleção de Estudos da Pós-graduação apoiou a edição de 13 livros, envolvendo diversos cursos de mestrado e doutorado de diferentes áreas do conhecimento.

