
MICROORGANISMOS

Prof. Carina Ladeira

Abril de 2008

MICROORGANISMOS

Principais microorganismos detectados:

- Bactérias
 - Fungos
 - Vírus
-

BACTÉRIAS

- Citoplasma constituído por proteínas, lípidos, iões e hidratos de carbono
 - Membrana citoplasmática semelhante à das células eucariotas
 - Não possuem colesterol, excepto os micoplasmas
 - Todas as bactérias, excepto os micoplasmas, possuem uma parede celular que protege a célula bacteriana da lise osmótica, confere-lhes forma e evita o contacto com substâncias externas nefastas
 - Peptidoglicano é um polímero constituído por cadeias de polissacáridos (N-acetilglucosamina – NAG- e ácido N-acetilmurâmico - NAM) ligadas entre si por péptidos
-

Bactérias

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

- Gram
- Ziehl Neelsen



TÉCNICA DE GRAM

- Permite a distinção entre organismos classificados de Gram + e Gram –

Gram +

- Cerca de 40 camadas de peptidoglicano (8-15 nm de espessura)
- Ácido lipoteicóico exposto à superfície, ancorado na membrana citoplasmática, ligado ao peptidoglicano

Gram –

- Peptidoglicano com 2 nm de espessura
 - Membrana externa, rica em proteínas e contendo lipopolissacárideos
-

Gram +

- Estafilococos (pneumonia)
 - Estreptococos
 - *Clostridium* (Colite pseudomembranosa)
 - *Corynebacterium* (cervicite)
 - Micobactérias
 - Lactobacilos (Bacilos de *Doderlein*)
 - Listeria
-

Gram -

- Neisseria
 - Escherichia
 - Klebsiella
 - Salmonella
 - Shigella
 - Proteus
 - Pseudomonas
 - Vibrio
 - Pasturella
 - Brucella
 - Haemophilus
 - Bordatella
-

TÉCNICA DE GRAM

- Técnica introduzida em 1884 pelo médico dinamarquês Hans Gram
 - É um dos mais difundidos para identificar numerosas bactérias em esfregaços citológicos e cortes histológicos
 - Permite efectuar a distinção entre microorganismos classificados com Gram + e Gram -
-

TÉCNICA DE GRAM

Protocolo

1. Solução de Violeta de cristal
 2. Lavagem em água corrente
 3. Solução de Iodina/Lugol
 4. Éter-acetona
 5. Lavagem em água destilada
 6. Contraste com Fucsina básica ou Safranina
-

TÉCNICA DE GRAM

Princípio

- Baseia-se na capacidade das bactérias Gram + quando coradas com o Violeta de cristal, de conservarem o corante após descoloração pelo álcool ou pela acetona, enquanto que as Gram – não possuem essa propriedade, ficando descoradas
 - Os microorganismos Gram + possuem paredes ricas em lipoproteínas e polissacarídeos e, conseqüentemente, possuem uma maior impermeabilidade, demonstrando uma retenção superior de corante Violeta de cristal
-

TÉCNICA DE GRAM

Princípio

- A utilização do Violeta de cristal seguido de Iodina, faz com que todas as bactérias coram indistintamente de azul escuro
 - A posterior lavagem com acetona vai descorar apenas algumas bactérias ficando apenas as Gram + coradas de azul escuro
 - A posterior aplicação de uma solução de contraste, p.e., Vermelho neutro, faz com que as restantes bactérias (Gram -) fiquem coradas de vermelho
-

TÉCNICA DE GRAM

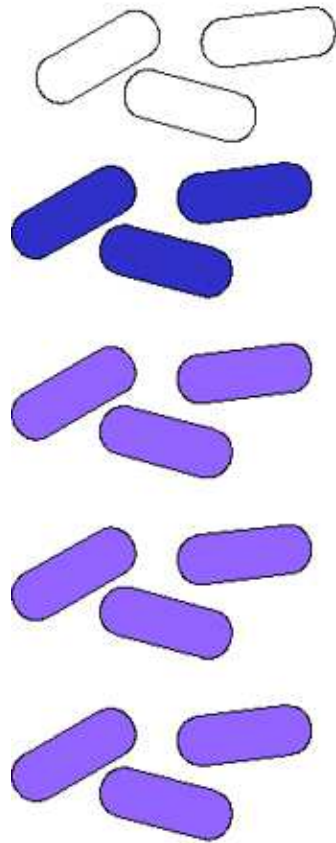
Princípio

- A diferença de coloração deve-se à existência de uma substância ácida nos microorganismos Gram + ao nível da parede, designada de magnésio ribonuclease, que formam complexos insólúveis com o Violeta de cristal e o iodo
 - Desta forma não se observa a acção da acetona sobre a coloração das bactérias Gram +
 - A exposição à acetona não pode ser muito prolongada, podendo arrastar por completo o corante de todas as estruturas
 - Esta técnica aplica-se nos casos de lesões inflamatórias sem características morfológicas específicas
-

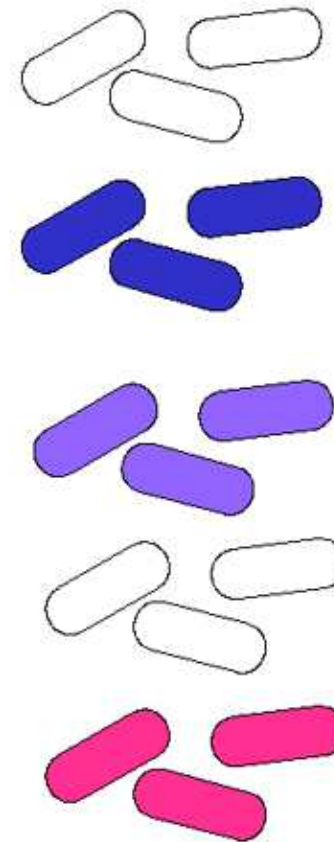
TÉCNICA DE GRAM

Resumo

Gram Positive



Gram Negative



Fixation

Crystal violet

Iodine treatment

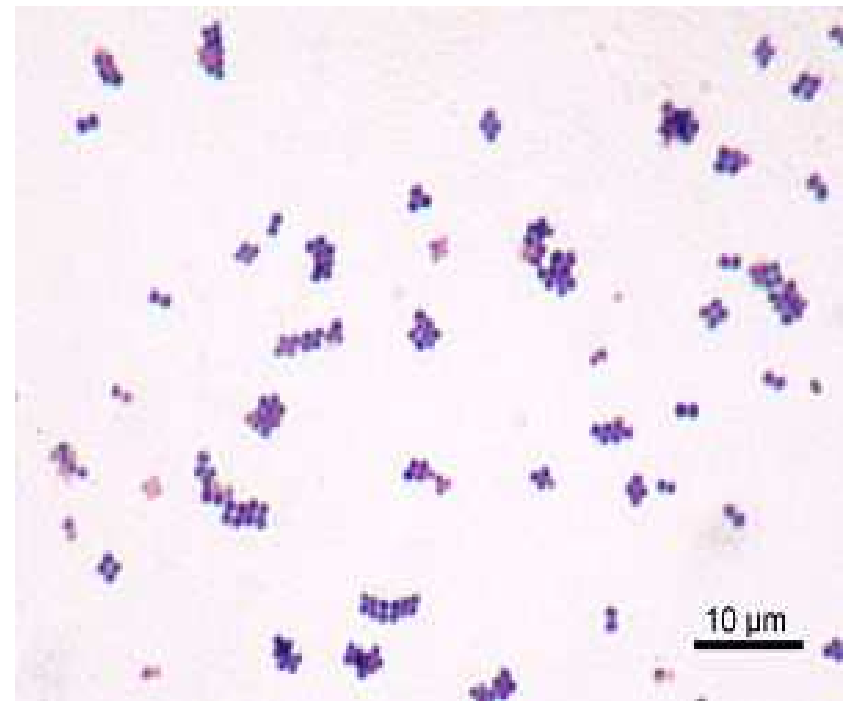
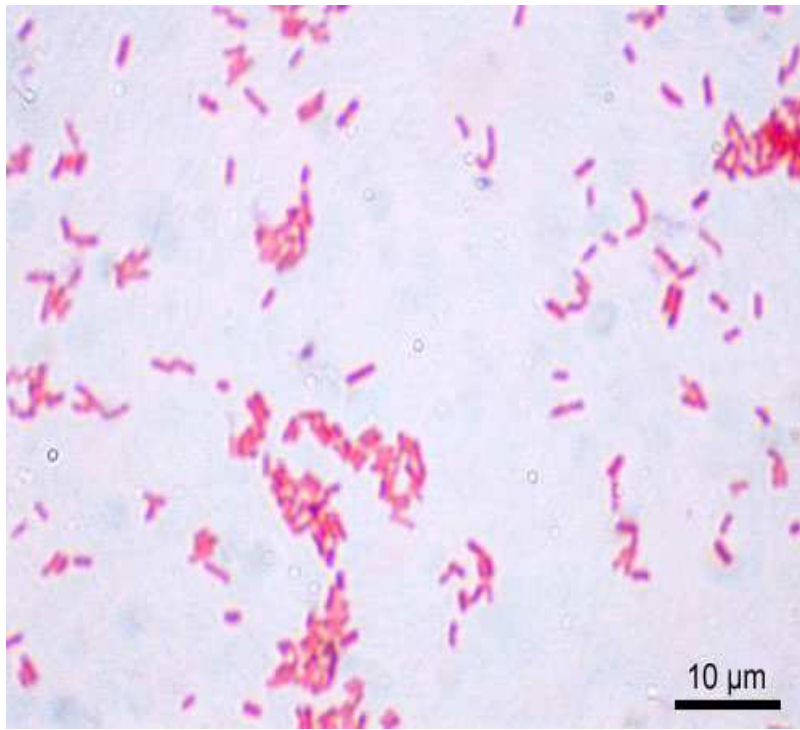
Decolorization

Counter stain
safranin

TÉCNICA DE GRAM

Resultados

- Bactérias Gram +: azul escuro
- Bactérias Gram -: rosa avermelhado



TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

- Ziehl, 1882 e Neelsen, 1883
 - Técnica com o objectivo de demonstrar as bactérias álcool-ácido resistentes, tal como o bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium Leprae*)
 - Estes bacilos possuem uma cápsula constituída por Ácido micólico e uma longa cadeia lípidica ácida o que a torna hidrofóbica
 - Esta cápsula constitui uma barreira à penetração e remoção do corante
 - Os microorganismos álcool-ácido resistentes possuem fracções lípidicas, combinadas com polissacarídeos, responsáveis pela retenção e pela resistência à acção do álcool-ácido
-

TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

- A parede celular dos bacilos álcool-ácido resistentes é constituída por: glicolípidos (lipoarabinomanano, arabinogalactano), cera D (ácido micólico-arabinogalactano-NAG-NAM), Ácido micólico (barreira à passagem das substâncias e sinalizador da resposta imune)
 - A cápsula é característica de cada estirpe patogénica, é um polímero que rodeia a célula bacteriana e tem como função a protecção contra o ataque fagocitário
-

TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

Protocolo

1. Solução de Zeihl Neelsen (Carbol-Fucsina + Fucsina básica + Fenol)
 2. Lavagem com água corrente
 3. Diferenciação com álcool clorídrico a 30%
 4. Lavagem com água destilada
 5. Azul de metileno
-

TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

Princípio

- A utilização de calor e de fenol contribuem para reduzir a tensão superficial da cápsula
 - Deste modo a porosidade da cápsula aumenta e o corante é forçado a penetrar
 - Os bacilos álcool-ácido resistentes coram de vermelho assim como todas as estruturas
 - O diferenciador vai remover o corante das estruturas não afins, cuja acção varia consoante a extensão da camada lípidica
-

TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

Princípio

- Os bacilos álcool-ácido resistentes permanecem corados de vermelho
 - O contraste com o azul metileno faz com que fique o fundo azul
 - Os microorganismos álcool-ácido resistentes possuem fracções lípidicas, combinadas com polissacarídeos, responsáveis pela retenção do corante e pela resistência à acção do álcool-ácido
-

TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

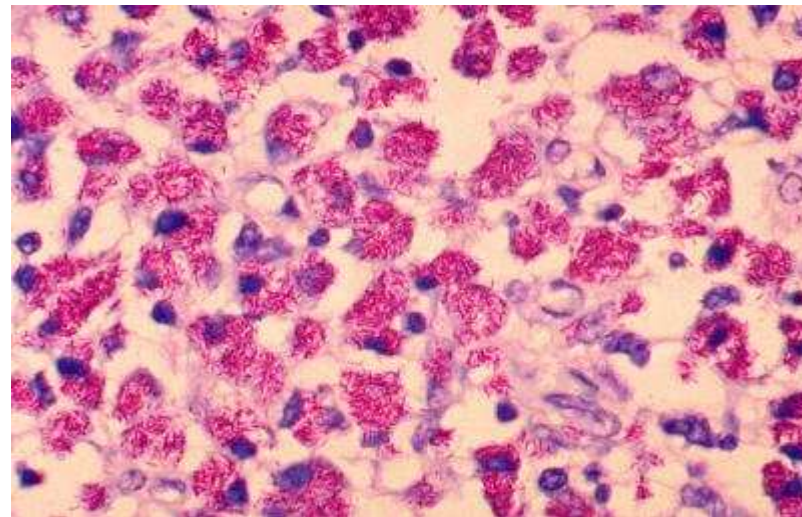
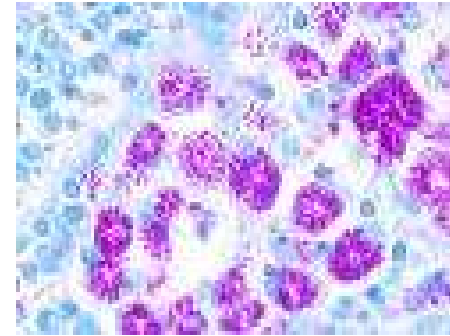
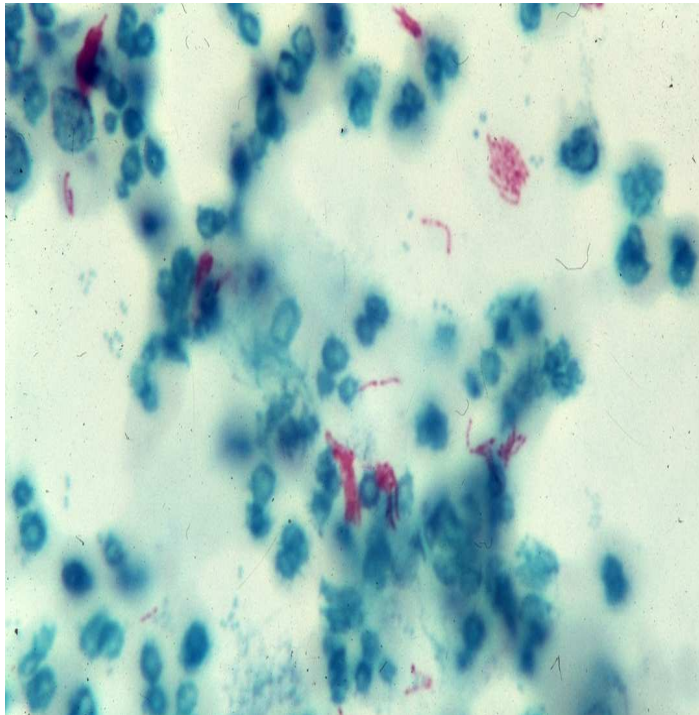
Resultados

- Bacilos álcool-ácido resistentes (Koch e Hansen) – vermelho
- Fundo - azul



TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

Resultados



GIEMSA MODIFICADO

- A técnica de Giemsa modificado surge de uma modificação da técnica *standard* de Giemsa
 - É utilizada para a demonstração de *Helicobacter pylori*
 - Utiliza como corante uma mistura de derivados tiacínicos catiónicos, os quais vão corar os núcleos e eosina como corante citoplasmático de carácter aniónico
-

GIEMSA MODIFICADO

Protocolo

1. Solução de Giemsa a 6%
 2. Álcool a 95%
 3. Álcool a 100%
-

GIEMSA MODIFICADO

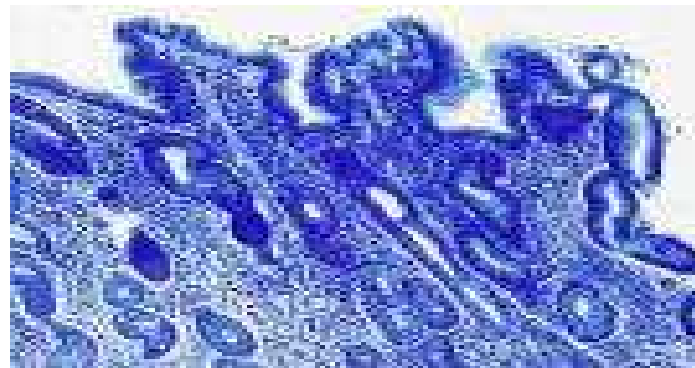
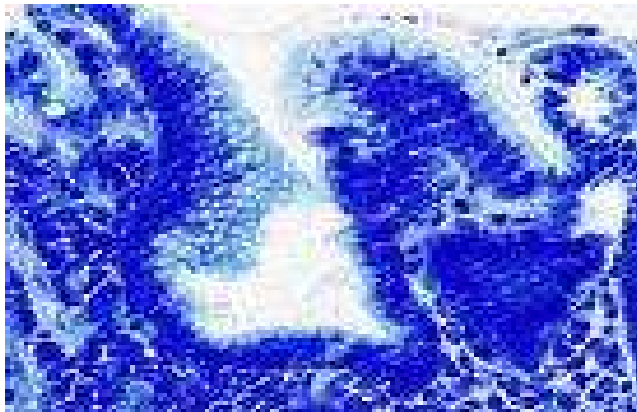
Princípio

- O fundamento desta técnica baseia-se na dissociação controlada de sais de eosinato que se formam ao insolubilizar a mistura Giemsa por diluição em água destilada
 - A eosina liberta o componente extracelular e determinadas estruturas acidófilas
 - Os derivados do Giemsa libertam as estruturas de carácter basófilo
 - Curiosamente a cromatina nuclear adopta uma coloração violácea distinta de todas as outras
-

GIEMSA MODIFICADO

Resultados

- Núcleos – azuis escuros
- *Helicobacter pylori* – azul escuro
- Eritrócitos – rosados
- Glândulas e estruturas tecidulares - azuis



TÉCNICA DE WARTHIN-STARRY

- Método de evidenciação de espiroquetas, utilizado com êxito na demonstração de *Helicobacter pylori*
 - *Helicobacter pylori* é um microorganismo reconhecido desde 1984 que está firmemente associado a gastrite e úlcera duodenal
 - É um bacilo Gram –
 - Pode ser identificado satisfatoriamente através de HE
-

TÉCNICA DE WARTHIN-STARRY

Protocolo

1. Celoidinização do corte
 2. Impregnação com solução de prata
 3. Revelação
 4. Tonificação
-

TÉCNICA DE WARTHIN-STARRY

Princípio

- A utilização de celoidina ou de gelatina promove a retenção da solução de impregnação
 - Impregnar com solução de Nitrato de prata a 55-60°C durante 90 a 105'
 - A solução de hidroquinona permite a redução do Nitrato de prata a prata metálica, pois as espiroquetas não possuem capacidade de reduzir a para
 - A hidroquinona é um composto fenólico que por oxidação se transforma em quinona, à medida que a prata é reduzida à sua forma metálica
-

TÉCNICA DE WARTHIN-STARRY

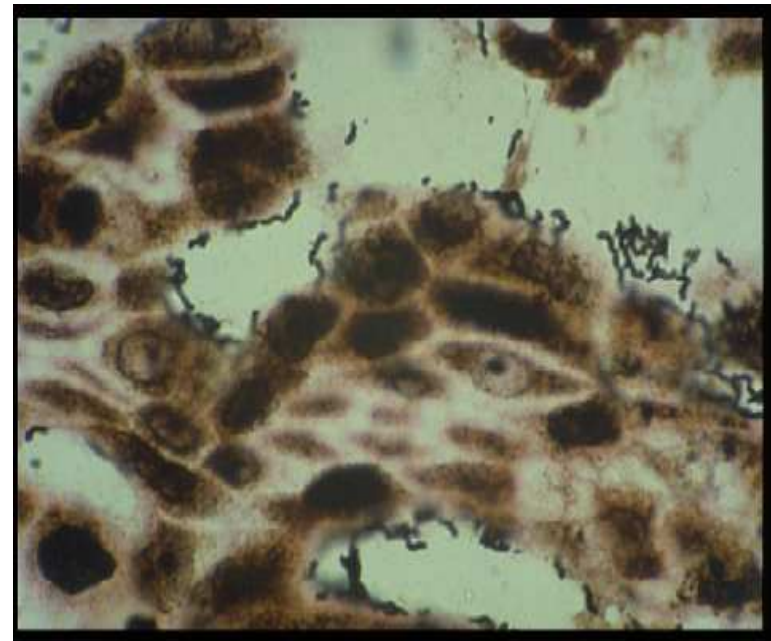
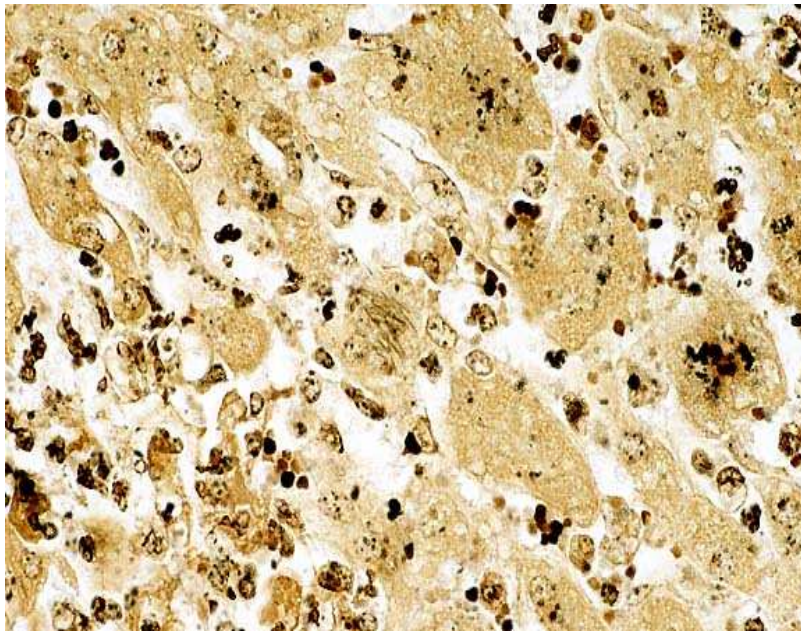
Princípio

- Por acção do Cloreto de ouro, a prata metálica (tonalidade castanho escuro) é oxidada em prata iónica e o Cloreto de ouro é reduzido a ouro metálico (tonalidade púrpura negro)
 - Se ocorrer sobre-revelação, tratar com iodo e tiosulfato de sódio e re-impregnar
 - A existência de melanina ou de outros pigmentos com afinidade para a prata poderá mascarar a evidenciação das espiroquetas
 - A solução de revelação deverá ser preparada antecipadamente, pois só devidamente amadurecida será eficaz
-

TÉCNICA DE WARTHIN-STARRY

Resultados

- Espiroquetas – negro
- Fundo – amarelo pálido ou castanho claro



TÉCNICA DE GROCOTT

- Gomori, 1946 e Grocott, 1955
 - Permite a demonstração de fungos
 - A maioria dos fungos é constituída por quitina, um polímero de N-acetil-glucosamina, D-glucose, D-manose, proteínas e lípidos
-

TÉCNICA DE GROCOTT

Protocolo

1. Ácido crômico a 5%
 2. Lavagem em água corrente
 3. Bissulfito de sódio a 1%
 4. Lavagem em água corrente e destilada
 5. Prata metenamina
 6. Cloreto de ouro
 7. Tiosulfato de sódio
 8. Contraste com Verde luz
-

TÉCNICA DE GROCOTT

Princípio

- O Ácido crómico promove a oxidação dos polissacarídeos da parede dos fungos, levando à formação de aldeídos
 - O processo de oxidação é propositadamente prolongado de forma a permitir a falência de determinados grupos aldeído recentemente formados, impossibilitando-os de se ligarem à prata (ex.: membranas basais e fibras de colagénio) somente as estruturas que possuem grandes quantidades de polissacarídeos resistem a esta acção (ex.: glicogénio, mucinas e paredes de fungos)
-

TÉCNICA DE GROCOTT

Princípio

- A lavagem com Bissulfito de sódio afim de remover o Ácido crómico
 - Os produtos resultantes da oxidação reduzem a solução de Prata metenamina a prata metálica possibilitando a sua visualização
 - O Borato de sódio da solução de trabalho funciona como tampão
 - Por acção do Cloreto de ouro, a prata metálica (tonalidade castanho escuro) é oxidada em prata iónica e o Cloreto de ouro é reduzido a ouro metálico (tonalidade púrpura negro)
-

TÉCNICA DE GROCOTT

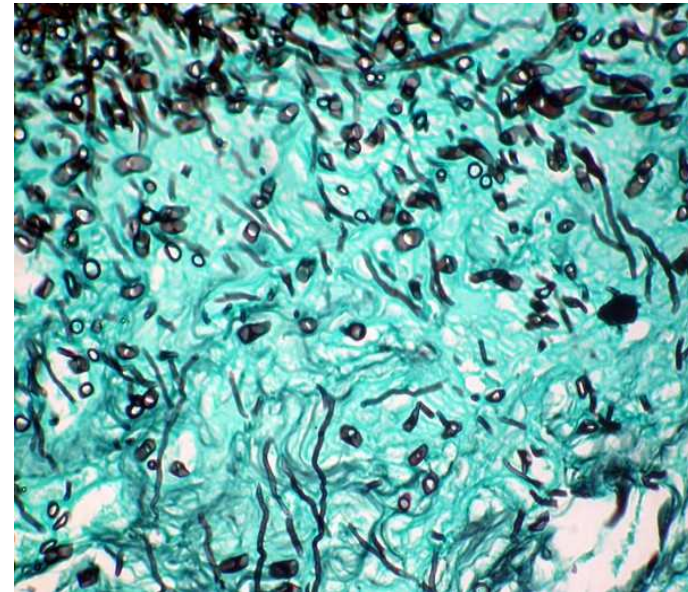
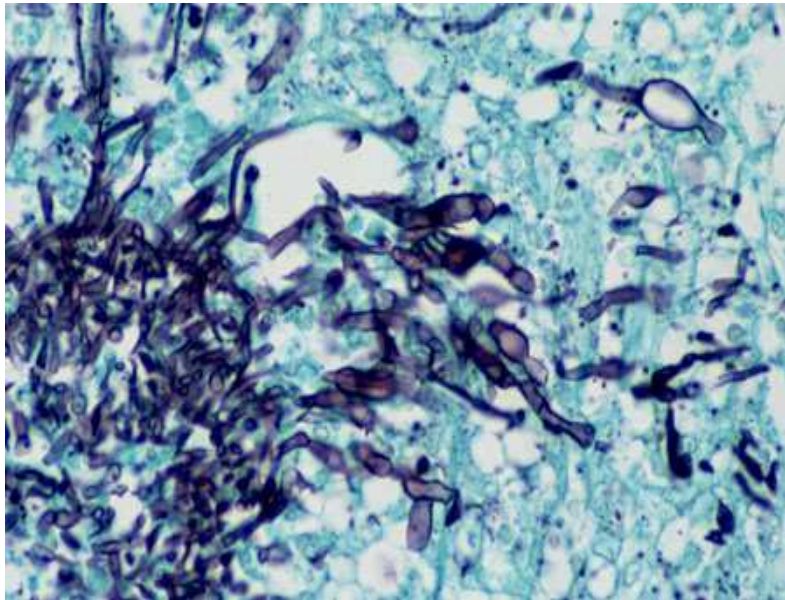
Princípio

- O Cloreto de ouro é mais estável que a prata metálica pelo que os cortes histológicos apresentam melhor contraste e definição
 - Utiliza-se o Tiosulfato de sódio, cujos iões formam um complexo solúvel com a prata iónica não-reactiva presente no tecido, permitindo a remoção da prata não reactiva
 - Contraste com Verde luz
-

GROCOTT

Resultados

- Fungos – delineados a negro
- Fundo - verde



Vírus

- Devido ao seu reduzido tamanho não podem ser visualizados directamente ao M.O.C.
 - O que pode ser visto são as suas inclusões no citoplasma das células infectadas
 - Colorações utilizadas:
 - Técnica de Macchiavello
 - Técnica do ácido fosfotúngstico-eosina
-

Considerações finais

- Em AP procura-se determinar se existem microorganismos nos tecidos e quais as suas espécies em várias situações como pesquisa ou estudo de:
 - Bactérias numa meningite purulenta
 - Bactérias numa pneumonia lobar
 - Bactérias num abscesso
 - Bacilos de Koch ou fungos numa lesão granulomatosa
 - Encefalite viral
 - Suspeita de infecção por *herpesvirus*
-

Considerações finais

- No entanto, a maior parte dos diagnósticos de presença de microorganismos em tecidos fixados são puramente indicativos e não definitivos
 - A palavra final cabe ao serviço de Bacteriologia, que por métodos mais específicos de detecção e por culturas de microorganismos vivos possui maior capacidade para um diagnóstico *in vitro*
-

RESUMO

- Caracterização
 - Aplicação diagnóstica
 - Gram
 - Ziehl- Neelsen
 - Giemsa Modificado
 - Warthin-Starry
 - Grocott
-