



Tipo do Documento	<b>PROCEDIMENTO / ROTINA</b>	POP.UACAP.017 – Página 1/5	
Título do Documento	<b>MICROBIOLOGIA: PREPARO DE LÂMINAS PARA MICROSCOPIA</b>	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

## 1. OBJETIVO

- Descrever a técnica empregada na UACAP para realização de lâminas destinadas à pesquisa direta de micro-organismos.

## 2. MATERIAL

- Suporte de coloração;
- Capela de fluxo laminar;
- Centrífuga;
- Microscópio óptico;
- Bisturi;
- Placa de petri;
- Reagentes de coloração de Gram;
- Óleo de imersão;
- Bico de Bunsen;
- Micropipeta de 25uL e 50uL;
- Ponteiros para micropipetas;
- Lâmina de borda fosca;
- Lamínula;
- Alça bacteriológica estéril de 10uL;
- Swab estéril;
- Salina estéril;
- Hidróxido de Potássio (KOH).

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.017 – Página 2/5	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: PREPARO DE LÂMINAS PARA MICROSCOPIA	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

### 3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

#### 3.1. Preparo geral por tipo de amostra

##### 3.1.1. Urina

Com a urina não centrifugada, e apenas homogeneizada, pegar uma alça com 10 uL de urina e depositar sobre uma lâmina de vidro com movimentos circulares, deixar secar, fixar na chama e corar pelo GRAM.

##### 3.1.2. Líquidos em geral (Líquor, Pleural, Pericárdico, Ascítico, etc..)

Materiais aparentemente límpidos devem ser previamente centrifugados a 2.000-5.000 rpm/15 minutos. Após a centrifugação, pipetar 50uL de sedimento numa lâmina limpa, sem espalhar, deixar secar, fixar na chama e corar pelo GRAM.

Materiais purulentos/viscosos pipetar 50uL da amostra (não centrifugada) numa lâmina limpa, espalhar em 1/3 da lamina, deixar secar, fixar na chama e corar pelo GRAM.

##### 3.1.3. Secreções em geral

Materiais recebidos em seringas serão transferidos para um tubo. Selecionar a porção mais purulenta ou mucosa com alça bacteriológica de 10uL. Amostras muito espessas ou purulentas podem ser diluídas com uma gota de salina estéril e espalhadas sobre uma grande área da lâmina formando um esfregaço delgado.

##### 3.1.4. Amostras em swab

Rolar o swab com suavidade em 2/3 da lâmina para evitar destruição celular formando uma camada delgada o suficiente para evitar superposição.

##### 3.1.5. Amostras respiratórias (AT, LBA e escarro)

Geralmente amostras respiratórias vem com solicitação médica para pesquisa de bactérias, fungos e BAAR. A bacterioscopia só é útil quando são obtidos materiais de sítios estéreis, **não sendo indicada** em outras situações. O resultado é questionável por não haver padronização de alíquotas ou quantificação de micro-organismos. Só deverá ser realizada na suspeita de algum agente infeccioso específico. As bactérias associadas aos quadros respiratórios, de uma forma geral,

Tipo do Documento	<b>PROCEDIMENTO / ROTINA</b>	POP.UACAP.017 – Página 3/5	
Título do Documento	<b>MICROBIOLOGIA: PREPARO DE LÂMINAS PARA MICROSCOPIA</b>	Emissão: 04/09/2025 Versão: 03	Próxima revisão: 04/09/2027

podem ser detectadas através de culturas, sendo essa considerada o padrão-ouro para o diagnóstico.

**OBS.** A pesquisa de fungos será realizada juntamente com a pesquisa de BAAR, por conta do risco de contaminação por aerossóis.

### 3.1.6. Secreção Vaginal

O preparo da lâmina acontece no ato da coleta. Para isso, na ausência de espéculo limpar a secreção externa com o auxílio de uma gaze estéril, introduzir o swab no intróito vaginal e realizar rotação para obter material. Realizar o esfregaço em lâmina, girando o swab com a amostra delicadamente sobre a superfície (não esfregar, pois esse procedimento destrói as estruturas celulares). Em seguida lave o mesmo swab em 1 ml de solução fisiológica estéril para a realização do exame a fresco;

### 3.1.7. Secreção Uretral

O preparo da lâmina acontece no ato da coleta. Para isso, desprezar as primeiras gotas da secreção. Coletar a secreção purulenta, de preferência pela manhã, antes da primeira micção ou há pelo menos duas horas ou mais, sem ter urinado. Coletar com swab estéril fino e realizar as lâminas para bacterioscopia girando o swab delicadamente sobre a superfície da lâmina (não esfregar, pois esse procedimento destrói as estruturas celulares).

### 3.1.8. Fragmentos de tecidos

Colocar o material em uma placa de petri estéril e com o auxílio de bisturi realizar a maceração da amostra. Em seguida colocar o material na lâmina e realizar o *imprint*.

## 3.2 Preparo das lâminas

### 3.2.1. Direto em salina

Permite observar a morfologia bacteriana e avaliar a existência de motilidade. Usada para pesquisa a fresco de Trichomonas e fungos (leveduriformes ou filamentosos) em diferentes materiais.

- 1º Colocar uma gota de salina no centro de uma lâmina de microscopia;
- 2º Suspender uma alçada do material a ser investigado na gota de salina;
- 3º Pipetar 50uL no centro da lâmina, se o material for líquido e límpido;
- 4º Cobrir com uma lamínula e examinar ao microscópio, com objetiva de 40X ou 100X.



Tipo do Documento	<b>PROCEDIMENTO / ROTINA</b>	POP.UACAP.017 – Página 4/5	
Título do Documento	<b>MICROBIOLOGIA: PREPARO DE LÂMINAS PARA MICROSCOPIA</b>	Emissão: 04/09/2025 Versão: 03	Próxima revisão: 04/09/2027

### 3.2.2. Hidróxido de potássio

Usado somente para pesquisa de fungos (leveduriformes e particularmente filamentosos) em material biológico na presença de muco, restos celulares, pelos, unhas, etc. Facilita a microscopia por dissolver a queratina e o muco, destacando as estruturas fúngicas, quando presentes.

- 1º Colocar uma pequena amostra do material a ser pesquisado no centro da lâmina;
- 2º Suspender o material com uma gota de KOH e dispor uma lamínula sobre a amostra;
- 3º Colocar a lâmina em câmara úmida e, após 24 horas, realizar leitura microscópica com objetiva de 10X ou 40X, fechando o diafragma.

### 3.2.3. Tinta da China

Indicada para pesquisa de criptococos, permitindo destacar a cápsula desse fungo contra um fundo negro.

- 1º Pipetar 10uL de tinta da China sobre a lâmina;
- 2º Pipetar 50uL de sedimento da amostra sobre a gota na lâmina e homogeneizar;
- 3º Acrescentar uma lamínula sobre a lâmina, deixando um filme bem delgado entre elas;
- 4º Levar ao microscópio e observar em objetivas de 10X e 40X.

### 3.2.4. Coloração de GRAM

- 1º Deixar esfregaço na lâmina secar naturalmente;
- 2º Fixar com calor brando (50°C) com auxílio de chama do bico de Bunsen;
- 3º Deixar a lâmina esfriar antes de iniciar a coloração;
- 4º Dispor as lâminas a serem coradas sobre o suporte de coloração;
- 5º Cobrir o esfregaço com a solução de cristal-violeta por cerca de 1 minuto;
- 6º Decantar o cristal-violeta e cobrir a área do esfregaço com a solução de iodo por cerca de 1 minuto;
- 7º Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona até que o solvente escorra incolor, alternando com água corrente (jato fraco). O tempo usualmente utilizado nessa etapa é de cerca de 10 segundos;
- 8º Cobrir o esfregaço com a solução de Fucsina básica 0.1% a 0.2%, por cerca de 30 segundos;
- 9º Lavar com água corrente;



Tipo do Documento	<b>PROCEDIMENTO / ROTINA</b>	POP.UACAP.017 – Página 5/5	
Título do Documento	<b>MICROBIOLOGIA: PREPARO DE LÂMINAS PARA MICROSCOPIA</b>	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

10º Deixar secar naturalmente;

11º Levar a lâmina para observar em microscópio.

#### 4. REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à saúde. Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame a análise microbiológica e laudo final.** Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à saúde. Módulo 3 – Principais Síndromes Infeciosas.** Brasília: Anvisa, 2013.

#### 5. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
01	29/06/2021	Elaboração do POP
02	08/08/2023	Revisão do POP
03	22/07/2025	Revisão do POP

<b>Elaboração</b> Letícia Cristina Limiere Janaina Narcizo Rodrigues	Data: 29/06/2021
<b>Revisão</b> 2ª Versão: Janaina Narcizo Rodrigues Letícia Cristina Limiere 3ª Versão: Janaina Narcizo Rodrigues Letícia Cristina Limiere	Data: 08/08/2023 Data: 22/07/2025
<b>Validação:</b> Fuad Fayez Mahmoud – STGQ	Data: 29/08/2025
<b>Aprovação:</b> Viviane Regina Noro – Chefe da UACAP Tiago Amador Correia - GAS	Data: 31/07/2025 Data: 04/09/2025

Assinado eletronicamente no processo SEI23529.011397/2023-14