

POP

HUAB-UFRN/EBSERH

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Versão: 1 | 2025

1. OBJETIVO(S)

Fazer a identificação das colônias bacteriana presentes nas placas de crescimento primário dos materiais clínicos enviados ao setor de microbiologia.

2. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- O Setor de Microbiologia do HUAB possui duas salas, uma de realização de procedimentos e outra de preparo de meio de cultura. Possui também uma sala para limpeza e descarte de todo material utilizado para os exames;
- Usar Equipamento de Proteção Individual (EPIs);
- Antes do início da rotina de trabalho, todo o ambiente é limpo e desinfetado com álcool a 70%. Caso aconteça algum acidente (derrame) com culturas de microrganismo durante o trabalho, imediatamente é colocado água sanitária sobre o material e deixado por 10 minutos. Após esse tempo, limpa-se com compressa de pano e desinfetando novamente com álcool a 70%. No final da rotina, todo o ambiente é novamente desinfetado.
- Para realizar a identificação bacteriana inicialmente realiza o semeio, conforme descritos nos POPS Urocultura e Hemocultura;
- Após 18 horas de incubação em estufa a 35°C analisar o tipo morfológico das colônias e o número de UFC (Unidade Formadora de Colônias). Geralmente as infecções do trato urinário contém um tipo morfológico apresentando contagem superior a 1000 UFC, o que corresponde a mais de 100.000UFC/mL de urina. Se houver mais de um tipo morfológico com contagem superior a 100 UFC descartar a placa e solicitar nova coleta de amostra.
- Se a contagem for menor que 100 UFC ou não houver crescimento algum, o resultado será negativo.
- Caso a contagem configure que a amostra é positiva. Diante de uma cultura positiva (> 100.000 UFC/mL) analisar o aspecto da colônia presumindo a sua identificação.
- Colônias maiores geralmente são bacilos Gram negativos da família Enterobacteriaceae e devem ser identificadas utilizando as provas bioquímicas interpretando de acordo com a tabela de identificação. Realizar antibiograma utilizando os discos padronizados aplicando os critérios de interpretação dos pontos de cortes do BrCAST. Outro bacilo Gram negativo frequentemente encontrado em uroculturas de paciente internado é a *Pseudomonas aeruginosa*. Colônias suspeitas tem um odor característico de “uva” e produzem reação de citocromo oxidase positiva.
- Colônias médias sugerem estafilococos, sendo os de interesse clínico, neste material, o *S. aureus* e o *S. saprophyticus* (este em mulheres em idade fértil). Realizar uma coloração de Gram para confirmação da presença de cocos Gram positivos, fazer a prova da catalase (positiva para estafilococos) e coagulase (positiva para *S. aureus*). Para identificação do *S.saprophyticus* testar o disco de novobiocina de 5µg (resistente).
- Colônias pequenas com aspecto puntiforme sugerem estreptococos, dos quais os mais importantes são: *Streptococcus agalactiae* e, também, os enterococos. Realizar uma coloração de Gram para confirmação de cocos Gram positivos em cadeias curtas e catalase negativo. Fazer o teste PYR que irá determinar o próximo passo da identificação: Se positivo, fazer as provas para enterococos (bile esculina, NaCl 6,5%,

Manitol, Arabinose e Xilose) e realizar antibiograma utilizando os discos padronizados para enterococos. Se PYR negativo, repicar em ágar sangue de carneiro 5% para posterior evidenciamento de beta hemólise, realizar o teste de CAMP e fazer o antibiograma em ágar Müller Hinton acrescido de 5% de sangue de carneiro. Confirmará a espécie se as colônias apresentarem beta hemólise e teste CAMP positivo (figura 1).

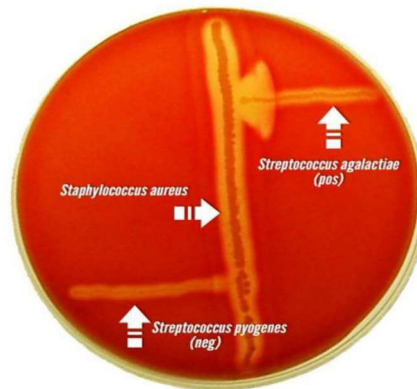


Figura 1: CAMP teste positivo a direita e negativo a esquerda.

Identificação de bactérias Gram negativas

- As bactérias da família *Enterobacteriaceae* crescem bem em ágar MacConkey, é um meio de cultura seletivo e diferencial para bactérias Gram negativas, serve para distinguir entre as que fermentam lactose (formando colônias cor-de-rosa) e as que não fermentam (que formam colônias incolores), apresentam colônias médias, mucoides, lisas e com bordas bem definidas.



FIGURA 2: Ágar MacConkey mostrando de um lado colônias Lactose positiva e Lactose negativa.

- As provas utilizadas pelo Setor de Microbiologia são: TSI – Tríplice Sugar Iron; CITRATO; SIM; Fenilalanina e meio de rugai modificado.

✓ TSI: Glicose/ Lactose/ Sacarose

O meio TSI é originalmente vermelho. Quando se torna totalmente amarelo a bactéria é fermentadora de glicose, lactose e sacarose (tubo 1); quando a parte inclinada permanece inalterada e a base amarela, a bactéria é fermentadora, porém lactose negativa (tubo 2); quando a

base se torna enegrecida, considera-se a bactéria fermentadora com H₂S positivo (tubo 3); no tubo 4 tem-se uma bactéria não fermentadora, pois o meio permaneceu inalterado. O meio pode mostrar também a produção de gás como no tubo 1.

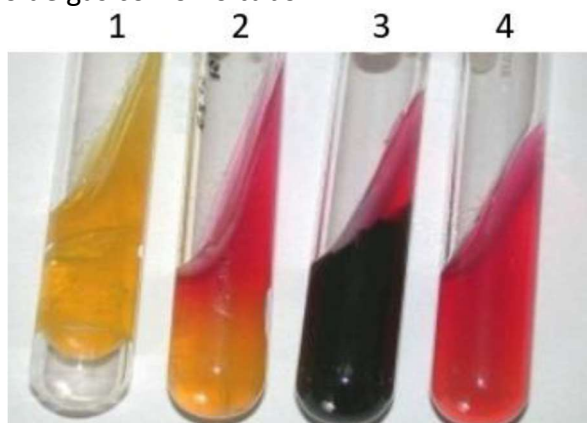


FIGURA 3: Meio de TSI mostrando os vários perfis de reação. Tubo 1: uma bactéria fermentadora com produção de gás; tubo 2, uma bactéria fermentadora lactose negativo. No tubo 3: uma bactéria fermentadora com produção de gás sulfídrico (H₂S). O tubo 4 representa uma bactéria não fermentadora.

✓ Fenilalanina

A segunda prova a ser interpretada é a Fenilalanina. O aminoácido aromático fenilalanina é desaminado oxidativamente por uma aminoácido-oxidase, a fenilalanina-desaminase, produzindo ácido fenilpirúvico. O cloreto férrico é um agente quelante que se liga ao ácido fenilpirúvico formando uma coloração verde. Se positiva, a bactéria pertence ao grupo *Proteus*, *Providencia* ou *Morganella*, excluindo todas as outras espécies.

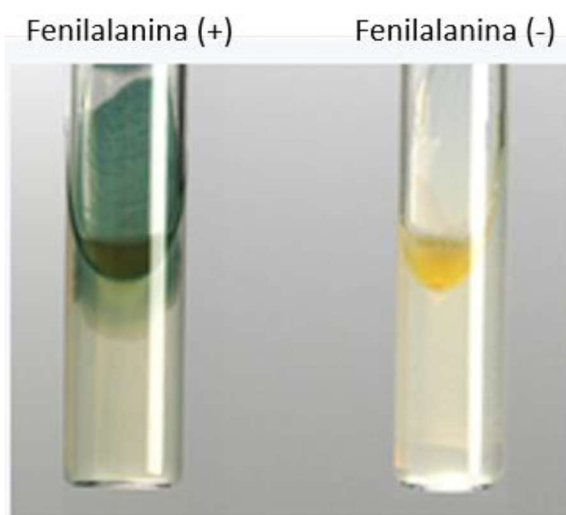


Figura 4: Prova bioquímica da Fenilalanina mostrando um teste positivo à esquerda e negativo à direita.

✓ Citrato

A terceira prova na sequência de identificação é o citrato. Essa prova testa a capacidade da bactéria em utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono. O meio original é verde e

quando positivo ele vira para azul. Frequentemente, encontramos uma prova positiva que apresenta crescimento, mas permanece verde. Uma prova de citrato positiva exclui *E. coli*.



FIGURA 5: Prova do Citrato mostrando um teste positivo à esquerda e negativo à direita. Notar que o tubo positivo mostra também o crescimento bacteriano.

✓ Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM)

É um meio diferencial que testa três parâmetros diferentes, que são representados pelas três letras no nome: Produção de H_2S (S), Produção de indol (I) e motilidade (M). O teste de produção de H_2S é útil na diferenciação de organismos entéricos. O teste de indol é utilizado para a diferenciação da família *Enterobacteriaceae*. O teste de motilidade é útil para verificar a capacidade de locomoção em uma grande variedade de bactérias.

Motil – Colocar 5 gotas de Reativo de Kovacs e homogeneizar. Se aparecer uma coloração rósea a prova é positiva.

✓ Meio de Rugai Modificado

Este meio é utilizado para identificar as principais espécies de Enterobactérias, Víbrios e Aeromonas, permitindo em um só tubo a leitura, das seguintes reações: motilidade da bactéria indicado pela turvação da lisina na base, lisina descarboxilase, fermentação da glicose em profundidade e da sacarose na superfície do meio, produção de gás sulfídrico (H_2S), gás em glicose, utilização do aminoácido L- triptofano (desaminação), hidrólise da uréia e no tampão do tubo, um desenvolvimento de coloração avermelhada que indica a formação de indol.

PROCEDIMENTO TÉCNICO:

- Retirar os tubos a serem utilizados do refrigerador e aguardar até que as mesmas alcancem a temperatura ambiente;
- Usando a agulha bacteriológica flambada, encostar na superfície de uma colônia e inocular através de uma picada central que atinja a porção inferior do meio lisina-motilidade, cuidando para não entortar a ponta da agulha.
- Ao puxar a agulha em direção à superfície, cuidar para que esta percorra o mesmo caminho e ao atingir a superfície fazer o estriamento.

INTERPRETAÇÃO:

- Desaminação do L-Triptofano: prova positiva quando há desenvolvimento de coloração verde garrafa no ápice do tubo e a prova negativa se caracteriza pela manutenção da cor original do meio ou cor amarelada;
- Fermentação da glicose: o surgimento de cor amarela na porção inferior de meio, caracteriza prova positiva, do contrário, o meio mantém-se inalterado; esta prova deve ser obrigatoriamente positiva para todas as enterobactérias, devendo-se atentar para o fato de que, nos casos de bactérias que produzem H₂S ou hidrolisam a uréia, a cor amarela é mascarada;
- Fermentação da sacarose: surgimento de cor amarelada na superfície do meio.
- Produção de gás a partir da glicose: caso a bactéria em estudo produza gás a partir da glicose, irão se formar bolhas no interior do meio, podendo em alguns casos o meio pode chegar a se partir e sofrer deslocamento;
- Produção de gás sulfídrico (H₂S): a produção de gás sulfídrico é evidenciada pelo surgimento de coloração negra com intensidade variável na porção inferior de meio;
- Hidrólise da uréia: considera-se a prova positiva quando há a formação de uma coloração azulada na porção inferior de meio.
- Descarboxilação da lisina: inicialmente o meio ficará amarelo indicando que a bactéria é viável, e no caso de haver a descarboxilação da lisina, o meio volta à cor púrpura original, do contrário, para prova negativa, o As colônias a identificar são semeadas por picada em profundidade e meio mantém-se amarelo.
- Motilidade: caso o crescimento bacteriano fique restrito à linha de picada considera-se a motilidade negativa, do contrário, para a motilidade positiva há um crescimento difuso com turvação parcial ou completa do meio;
- Indol: o surgimento de uma cor vermelha na tampa caracteriza a prova positiva.

Fase Superior

Ápice: azul: sacarose negativa LTD negativo

Amarelo: sacarose positiva LTD negativo

verde garrafa: sacarose negativa LTD positivo

castanho: sacarose positiva LTD positivo

Base: Amarelo: glicose positiva

Base: amarelo: glicose positiva

Azul: uréia positiva

Preto: H₂S positivo

Amarelo com bolhas: glicose e gás positivos

Fase Inferior:

Violeta: lisina descarboxilase positiva

Amarelo: lisina descarboxilase negativa

Com turvação: motilidade positiva (móvel)

Sem turvação: motilidade negativa se observa nitidamente o crescimento



Fonte: Mbiolog, 2018⁸.

FIGURA 6: Identificação presuntiva de bacilos Gram negativos no meio de Rugai com Lisina

TABELA DE DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTÉRIAS

Características da cultura após de 18-24 horas a 35-37°C.

Organismo	LTD	GLI	GAS	H2S	URE	LIS	MOT	IND	SAC
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Shigella</i>	-	+	-	-	-	-	-	+/-	-
<i>Salmonella</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Proteus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+/-	-
<i>Enterobacter</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>Citrobacter</i>	-	+	+	+/-	-	-	+	+/-	+/-
<i>Klebsiella</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Serratia</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Providencia</i>	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+/-

Identificação de bactérias Gram Positivas

- Crescimento em Ágar Sangue é um meio de cultura microbiológico enriquecido e diferencial, observa sua capacidade de destruir glóbulos vermelhos (hemólise), sendo fundamental para identificar e caracterizar patógenos como estreptococos e estafilococos.
- Crescimento em Ágar manitol salgado é um meio de cultura seletivo e diferencial usado em microbiologia para isolar e identificar bactérias do género Staphylococcus, especialmente o Staphylococcus aureus.

- Coloração de Gram

- ✓ Catalase

Detectar a presença da enzima catalase na bactéria e com base no resultado obtido auxiliar na identificação de gêneros e espécies bacterianas. Classicamente utilizado na diferenciação de estafilococos (catalase positiva) e estreptococos (catalase negativa).

- ✓ Coagulase

É misturando uma amostra bacteriana com plasma sanguíneo para observar a formação de um coágulo. A enzima coagulase, produzida pelo *S. aureus*, reage com o plasma para formar fibrina, que causa a coagulação. Um resultado positivo indica *S. aureus*.

(+) *Staphylococcus aureus*

(Neg) *Staphylococcus* spp. em Sangue

(Neg) *Staphylococcus saprophyticus* (a prova de resistência à novobiocina, permite distinguir cepas de *Staphylococcus saprophyticus* de outros estafilococos).

NOTA: Casos de confirmação de resultados enviar o semeio para HUOL ou MEJC.

3. REFERÊNCIAS.

EBSERH. Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. **POP.UACAP.024 - ROTINAS DE TRABALHO NO SERVIÇO DE MICROBIOLOGIA**, Disponível: https://www.gov.br/ebserh-/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sudeste/hc-uftm/documentos/procedimentos-e-rotinas-operacionais-padrao/pops/pop-uacap-024_rotinas_de_trabalho_no_servico_de_microbiologia-versao-2.pdf. Acesso em 09/09/2025.

DEMIP – ICBS- UFRGS. **Identificação de bactérias**, Disponível: https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdempip/?page_id=27. Acesso em 26/09/2025.

MEIO RUGAI MODIFICADO (cód.1128). RenyLab, Disponível: <https://www.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Meio-Rugai-Modificado.pdf>. Acesso em 30/09/2025.

4. HISTÓRICO DE REVISÃO

Versão	Data	Descrição da atualização
1	09/09/2025	Versão inicial do documento.

5. RESPONSÁVEIS PELO DOCUMENTO

Elaboração Nahara de Medeiros Cabral Axiole - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS Glauber Lopes Costa de Oliveira - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS	Data: 09/09/2025
Análise Nahara de Medeiros Cabral Axiole - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS	Data: 09/09/2025
Validação Wilton Nogueira de Abreu - STGQ/SUP Franciane Carla de Souza Bento - STGQ/SUP	Data: 28/10/2025
Aprovação Kellynton Diego Dantas de Souza - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS	Data: 28/10/2025

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que indicada a fonte e sem fins lucrativos. © Ano 2025, Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares. Todos os direitos reservados www.ebserh.gov.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ANA BEZERRA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
Praça Tequinha Farias, nº 13 - Bairro Centro, Santa Cruz/RN, CEP 59200-000
- <http://huab-ufrn.ebserh.gov.br>

Certidão - SEI

Processo nº 23527.007574/2025-31

Interessado: @interessados_virgula_espaco@

CERTIDÃO DE ASSINATURAS
IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.POP.UDIDE.072 - versão 1
RESPONSÁVEIS PELO DOCUMENTO

<p>Elaboração Nahara de Medeiros Cabral Axiole - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS Glauber Lopes Costa de Oliveira - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS</p>	<p>Data: 09/09/2025</p>
<p>Análise Nahara de Medeiros Cabral Axiole - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS</p>	<p>Data: 09/09/2025</p>
<p>Validação Wilton Nogueira de Abreu - STGQ/SUP Franciane Carla de Souza Bento - STGQ/SUP</p>	<p>Data:</p>
<p>Aprovação Kellynton Diego Dantas de Souza - UDIDE/STMIM/DCDT/GAS</p>	<p>Data:</p>



Documento assinado eletronicamente por **Nahara de Medeiros Cabral Axiole, Biomédico(a)**, em 29/10/2025, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, caput, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kellynton Diego Dantas de Souza, Chefe de Unidade**, em 29/10/2025, às 15:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, caput, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauber Lopes Costa de Oliveira, Farmacêutico(a)**, em 03/11/2025, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, caput, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wilton Nogueira de Abreu, Técnico(a) em Enfermagem**, em 06/11/2025, às 09:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, caput, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ebserh.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **54740981** e o código CRC **48377F9B**.