



UAlg ESS

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Ciências Biomédicas Laboratoriais

Métodos Cito-Histoquímicos

Aula 9

2016/17

João Furtado

jffurtado@ualg.pt

Gab. 2.06 na ESSUAlg

Sumário

Microorganismos

Introdução

Bactérias

Cocos

Bacilos

Curvas ou espirais

Filamentosas

Técnica Gram

Ziehl-Neelsen

Warthin-Starry

Giemsa modificado

Microorganismos

Colorações histoquímicas (especiais)

- ❑ Extremamente abundantes (considera-se que metade da biomassa da biosfera está constituída por microorganismos)
- ❑ Partilham a característica de serem apenas visíveis ao microscópio
- ❑ Quando não existe suspeita de um processo infeccioso a identificação histológica torna-se fundamental para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo
- ❑ A coloração H&E apresenta alterações morfológicas que fazem suspeitar de um processo infeccioso derivado de um microorganismo desconhecido
- ❑ Microorganismos provocam reações específicas nos tecidos que variam com o estado da infeção

- ❑ Dados morfológicos + clínicos diminuem o número de microorganismos a serem identificados como causadores de uma dada alteração ou resposta tecidual
- ❑ Várias técnicas imunohistoquímicas e de biologia molecular que permitem fazer o diagnóstico diferencial de vários tipos de microorganismos:
 - ❑ Extremamente dispendiosas e não se mostram mais eficazes que as colorações histoquímicas
- ❑ Os agentes patogénicos que causam doenças:
 - ❑ Bactérias
 - ❑ Vírus
 - ❑ Fungos
 - ❑ Protozoários
 - ❑ Helmátodes

Bactérias

- ❑ Possuem uma parede celular rica em complexos lipídicos e glicolípidos
- ❑ A quantidade de lípidos presentes na membrana celular bacteriana e o seu grau de saturação vão ditar o sucesso da coloração
- ❑ Os lípidos insaturados possuem uma grande quantidade de grupos ácidos carboxil e hidroxil → fucsina e violeta de cresil
- ❑ Os métodos utilizados para evidenciar bactérias sofreram pouca mudança

- ❑ Franz Ziehl e Friedrich Nielsen desenvolveram o método criado Ehrlich, mantendo-se como método de referência para **micobactérias**
- ❑ Hans Christian Gram desenvolveu um método para classificar **bactérias** em dois grupos tendo em conta as suas afinidades tintoriais
- ❑ Técnica Ziehl-Neelsen utiliza a fucsina básica para corar os microorganismos
- ❑ Técnica Gram utiliza o violeta de cristal
- ❑ São corantes catiónicos (básicos) com uma forte afinidade para a cromatina nuclear assim como outras estruturas com características aniónicas (ácidas)
- ❑ O violeta de cristal possui maior lipossolubilidade e 3x mais solúvel em álcool que a fucsina

❑ **Importante reter:**

- ❑ Micobactérias, possuem uma parede celular rica em cadeias lipídicas de ácido micólico
- ❑ Difícil demonstração utilizando a técnica de Gram
- ❑ Certas micobactérias são Gram+
- ❑ As bactérias Gram- possuem uma maior quantidade de lípidos na sua membrana celular e uma camada fina de peptidoglicano

Bactérias – Morfologia

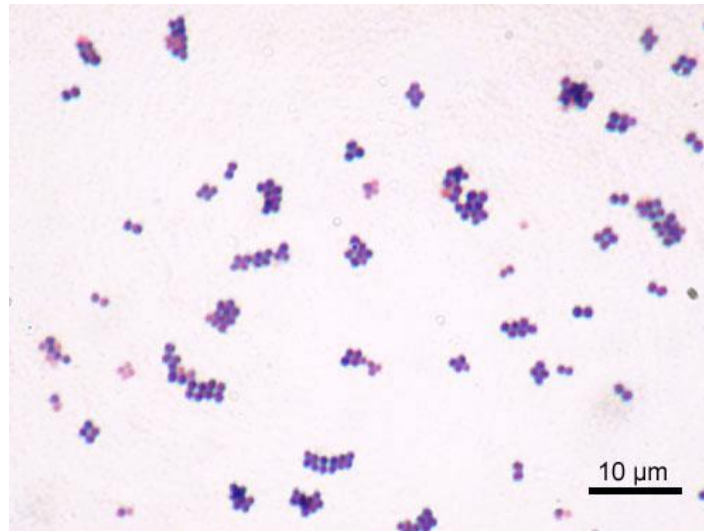
- ❑ Forma de um bastonete (por vezes curvo): Bacilo

- ❑ Forma esférica:
 - ❑ Cocos – forma isolada
 - ❑ Diplococos – cocos aos pares
 - ❑ Estreptococos – cocos em cadeia
 - ❑ Estafilococos – cocos em agrupamentos

- ❑ Forma de saca rolhas: espiroquetas

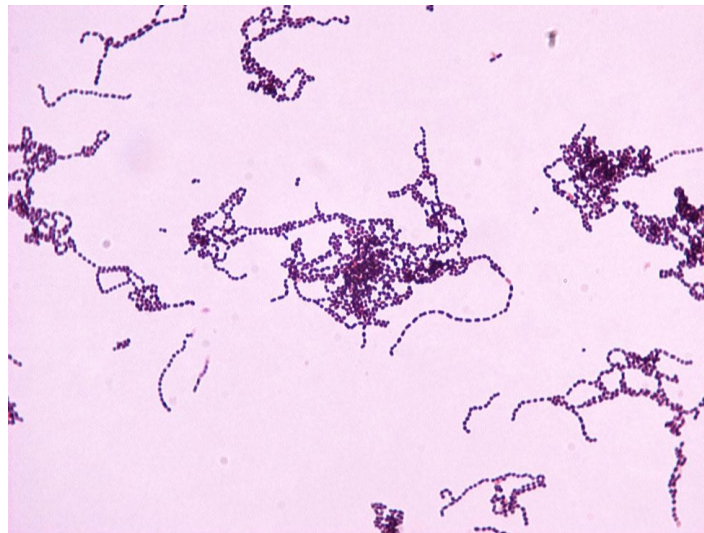
Cocos – Estafilococos

- ❑ São Gram+
- ❑ Maior relevância é o estafilococo aureus: lesões cutâneas → septicemia fatal
 - ❑ Infecções nosocomiais (origem hospitalar)
 - ❑ Multi-resistentes
 - ❑ Apresentam-se como argumentos irregulares tridimensionais



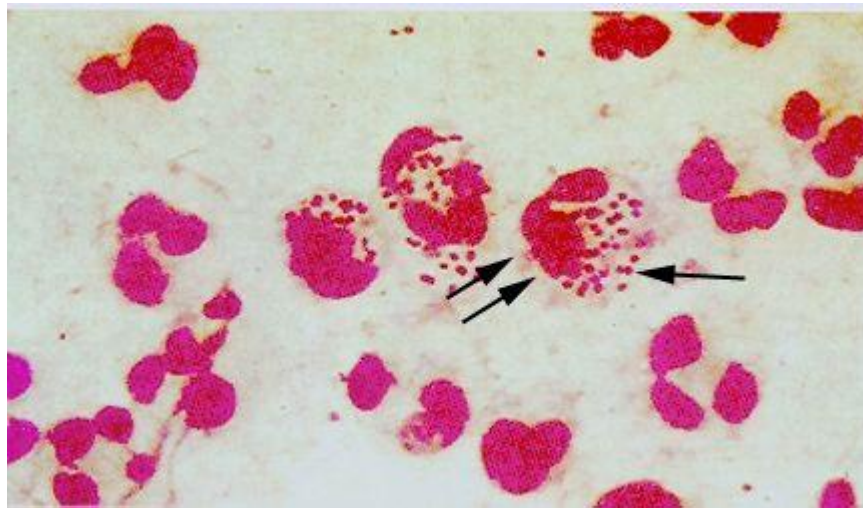
Cocos – Estreptococos

- ❑ São Gram+
- ❑ Várias espécies de significância a nível patológico: estreptococo pneumoniae
 - ❑ Apresentam-se aos pares ou em cadeias curtas
 - ❑ Podem causar infeções a nível da cavidade oral, sistema linfoide, tecido cardíaco ou intestinal

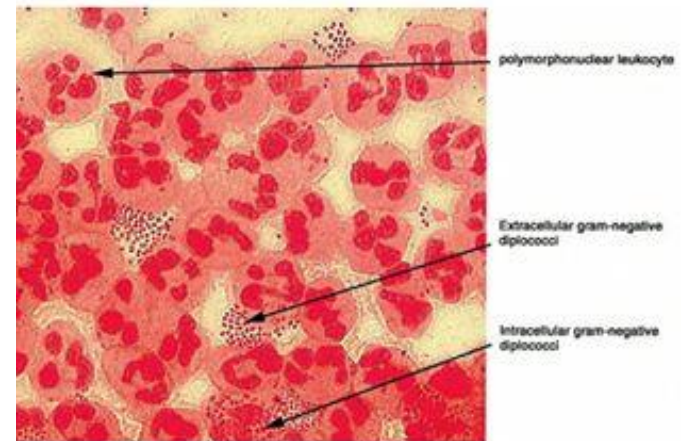


Cocos – Neisseria

- ❑ São Gram-
- ❑ Difícil visualização histológica
- ❑ Maior relevância: *Neisseria gonorrhoea*
 - ❑ Coram com Giemsa: grãos de café aos pares
- ❑ *Neisseria meningitidis*: causa meningite

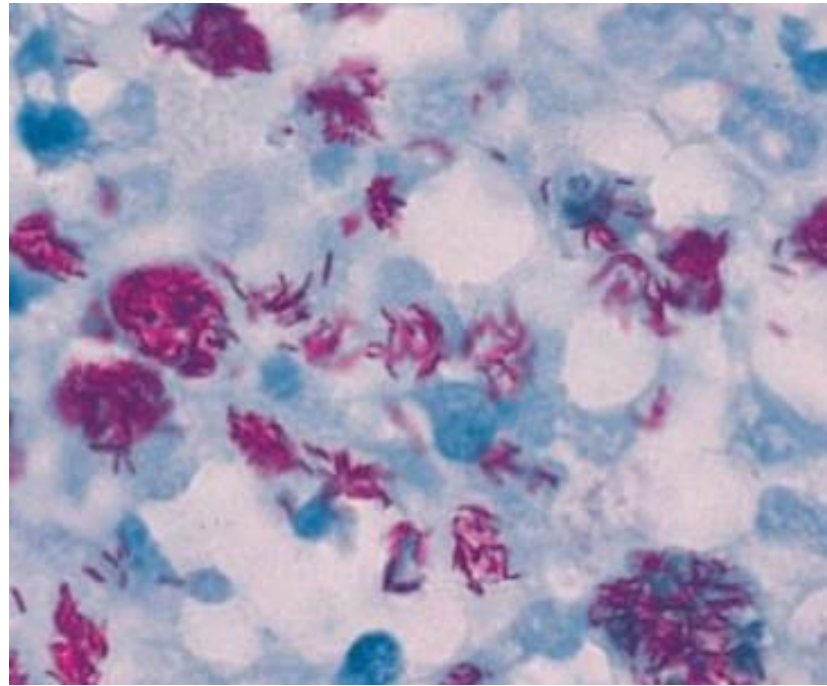


Neisseria gonorrhoeae



Bacilos - Micobactérias

- ❑ Compreende bactérias como M. tuberculosis e o M. leprae
- ❑ M. tuberculosis: lesões nodulares granulomatosas com necrose
 - ❑ Apresenta-se isoladamente, pares ou pequenos agrupamentos paralelos
- ❑ M. leprae: destrói nervos, especialmente na pele
 - ❑ Apresenta-se em grandes agrupamentos paralelos
- ❑ Ambas Gram+, corando igualmente com Giemsa. No entanto adquirem uma coloração resistente aos ácidos pela técnica Ziehl-Neelsen



Bacilos Gram+ e Gram-

Gram+

- Bacillus anthracis
- Clostridium
 - Perfringens
 - Tetani
 - Botulinium
- Corynebacterium diphtheriae

Gram-

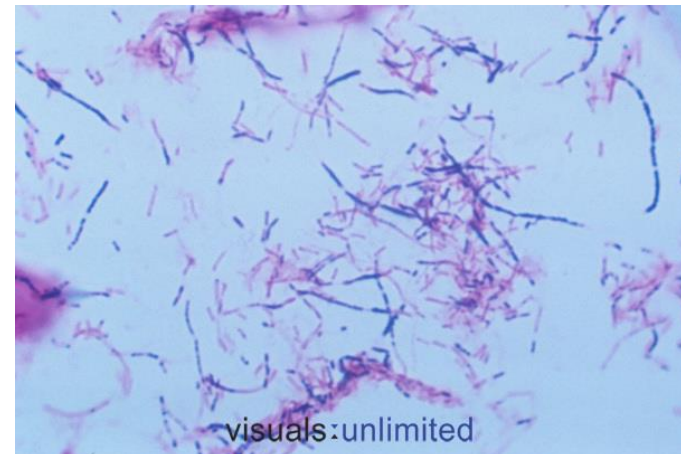
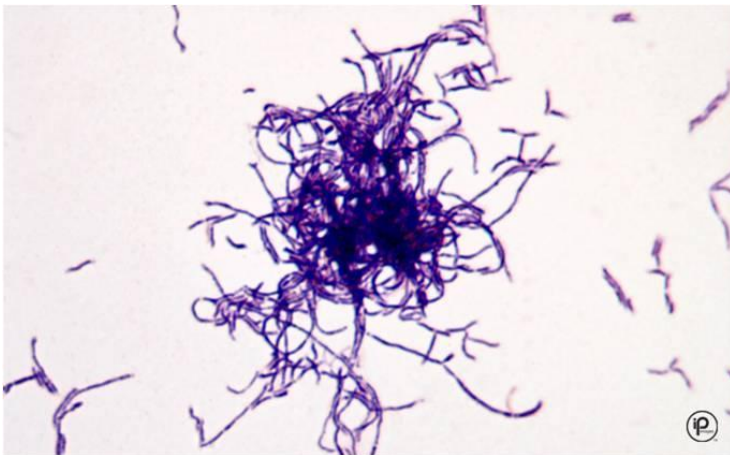
- Eschericia coli
- Salmonella typhi
- Pseudomonas aeruginosa
- Legionella pneumophila

Bactérias Curvas ou Espirais

- ❑ Vibrio cholerae: **Gram-**
- ❑ Camphylobacter: **Gram-**
- ❑ Helicobacter pylori: **Gram+** (percursora da neoplasia gástrica)
- ❑ Treponema pallidum: **Gram-** (causadora da sífilis)

Bactérias Filamentosas/Miceles

- ❑ Várias bactérias com significância patológica: formam colônias de estruturas filamentosas (como tal assemelham-se a fungos)
- ❑ Actinomicetes: **Gram+** (ácido-resistentes)
 - ❑ Agrupamentos densos com formações filamentosas
- ❑ Nocardia asterioides: **Gram+** (ácido-resistentes)
 - ❑ Não forma colônias, apenas uma estrutura filamentosa em ângulos retos



Bactérias – Técnica Gram

- ❑ Evidenciar características morfológicas das bactérias (Gram+ ou Gram-)
- ❑ Coloração com violeta de cristal → solução mordente contendo iodo → diferenciação alcoólica ou acetona
- ❑ Gram+, retém o violeta de cristal (azul ou negro)
- ❑ Gram-, perdem a coloração durante o passo de contraste
 - ❑ Podem ser observadas pela utilização de um corante de contraste (vermelho neutro)

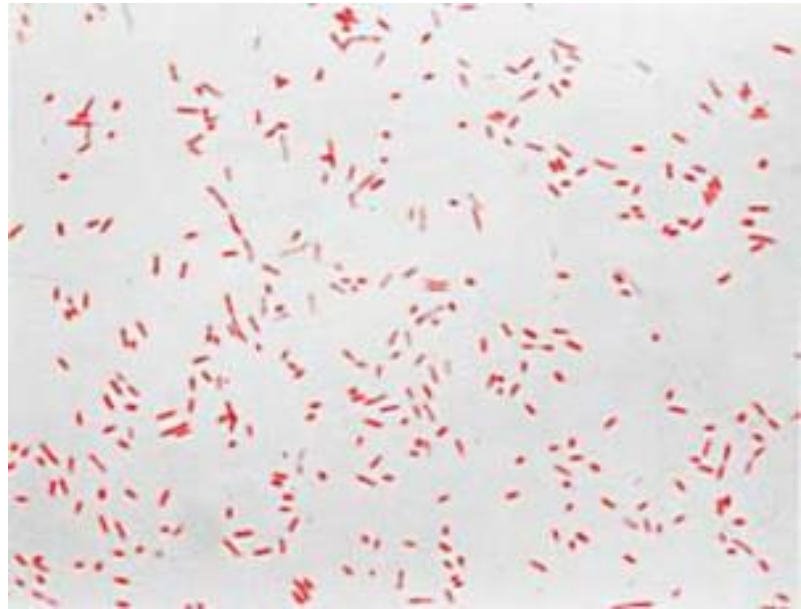
Técnica Gram (cuidados)

- ❑ A diferenciação deve ser efetuada rapidamente
 - ❑ Exposição prolongada leva à remoção do corante de todas as bactérias
- ❑ O iodo (mordente) forma um complexo com o violeta de cristal → torna o complexo menos lipofílico, o que acelera a remoção do corante das Gram-

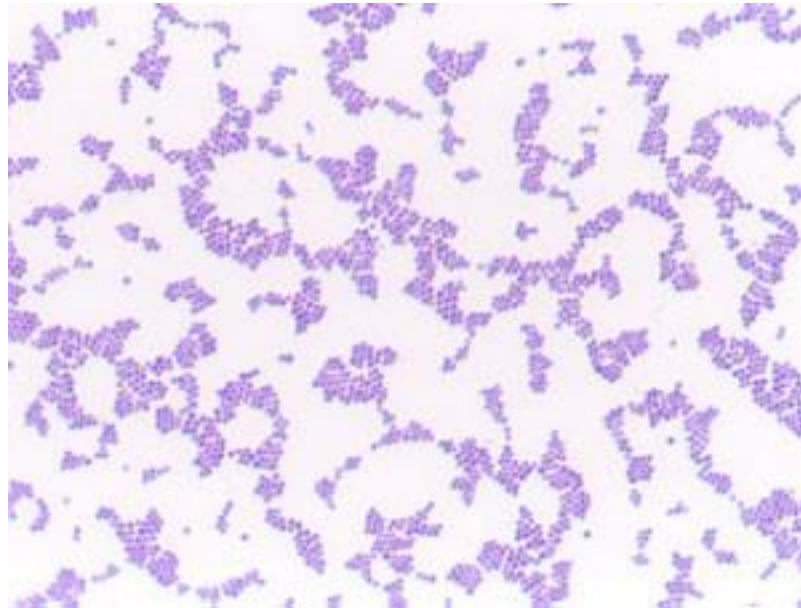
Protocolo Gram

- Desparafinar e hidratar
- Corar com solução filtrada de violeta de cristal
- Lavar os cortes com solução de iodina
- Diferenciar com acetona
- Lavar em água corrente
- Contrastar com vermelho neutro
- Desidratar, diafanizar e montar

Bactérias **Gram-** (cor rosa)



Bactérias **Gram+** (cor roxo)

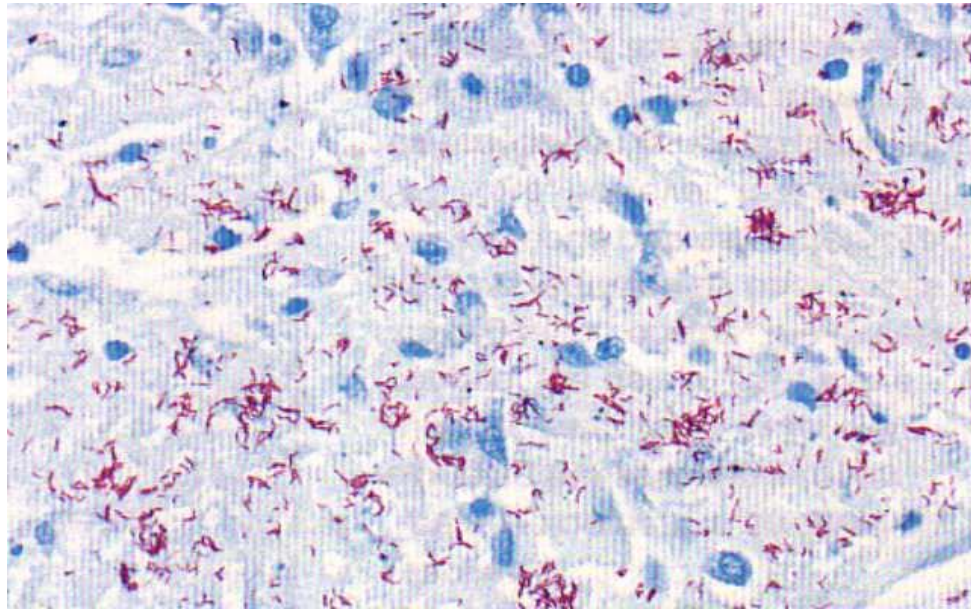
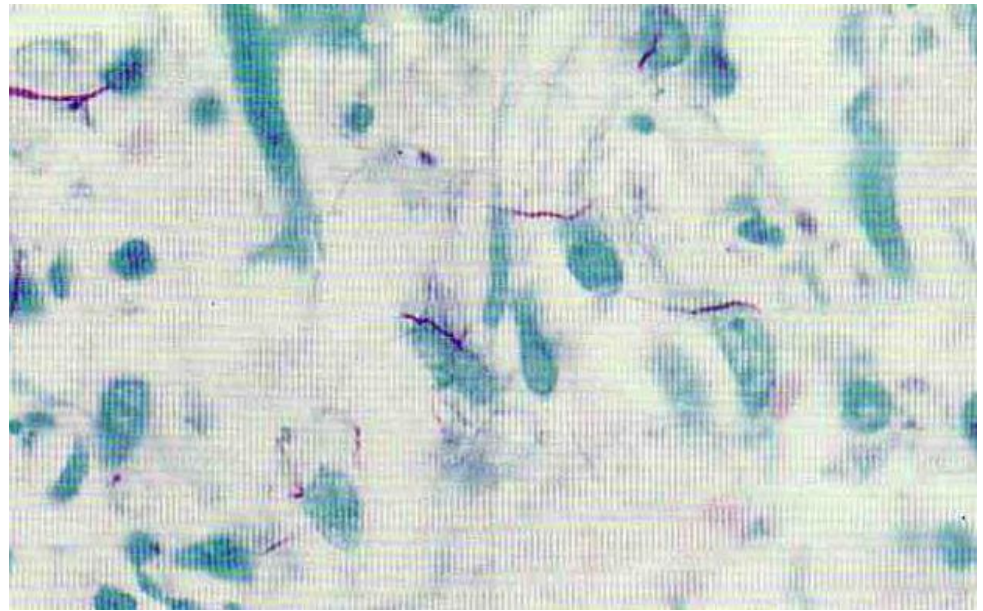
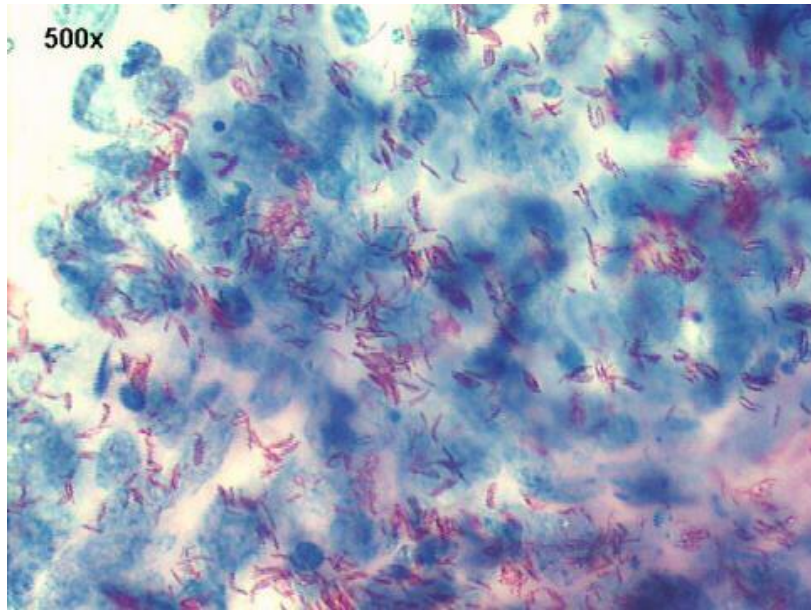


Bactérias: Ziehl-Neelsen

- ❑ Microorganismos ácido-resistentes não coram consistentemente com a técnica de Gram, embora alguns possam ser demonstrados Gram+
- ❑ Recorre ao uso da fucsina básica que se liga às cadeias de ácido micólico dos lípidos insaturados presentes na membrana celular das micobactérias
- ❑ A fucsina é menos lipofílica que o violeta de cristal, tornando a penetração do corante difícil, para sobrepor esta barreira é adicionado fenol à solução
- ❑ Após o corante se ligar aos grupos ácidos da membrana celular torna-se impossível de remover o corante recorrendo a soluções ácidas ou alcoólicas

Protocolo Ziehl-Neelsen

- Desparafinar e hidratar
- Corar com carbolfucsina a 65°
- Escorrer o corante das lâminas e deixar secar ao ar
- Diferenciar em álcool ácido
- Lavar em água corrente
- Contrastar com azul de metileno
- Passar por água
- Desidratar, diafanizar e montar

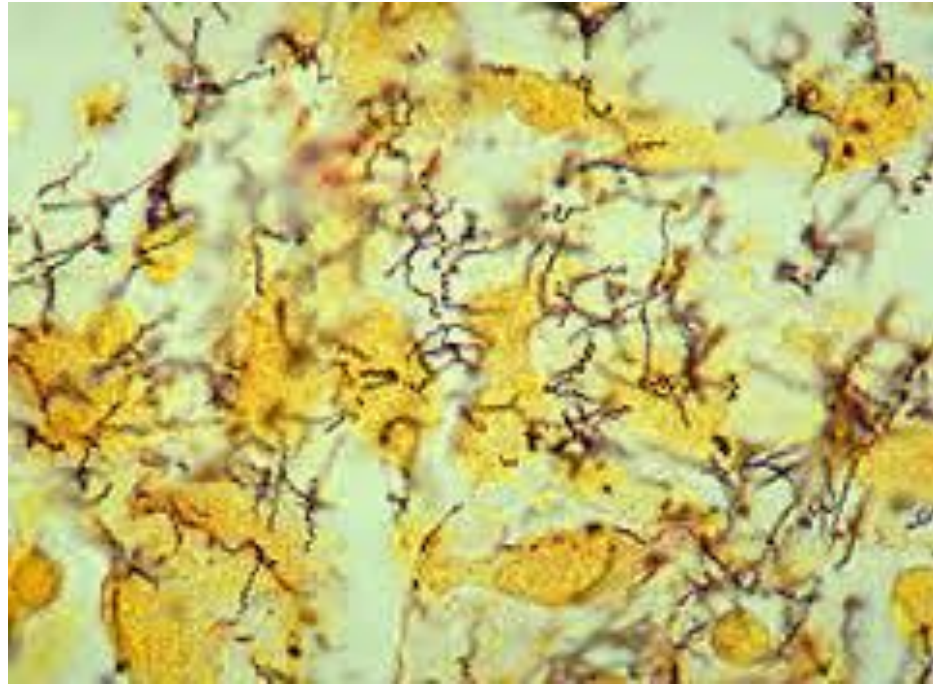


Bactérias – outras técnicas

- ❑ Maioria das bactérias cora com solução **Giemsa**
- ❑ Em quantidade suficiente são coradas pela **H&E**
- ❑ As bactérias serem coradas pelo **PAS** certifica que possuem glicolípidos na sua membrana celular
- ❑ As técnicas que utilizam prata permitem o diagnóstico quando a morfologia das bactérias é característica
 - ❑ Ex: espiroquetas

Protocolo Warthin-Starry

- Desparafinar e hidratar
- Tampão de acetato
- Passar para uma solução de nitrato de prata e incubar a 60°
- Passar as lâminas para a solução reveladora e manter em banho-maria a 60°
- Lavar em água quente
- Passar para o tampão de acetato
- Passar por água
- Desidratar, diafanizar e montar



Protocolo Giemsa modificado

- Desparafinar e hidratar
- Solução Giemsa a 4%
- Lavagem em água
- Diferenciar com solução de álcool acético ou álcool
- Para a diferenciação com álcool absoluto
- Diafanizar e montar

