

ACT – ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

ANGELO TRENTO

COLORAÇÕES USADAS EM MICROBIOLOGIA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2018

ANGELO TRENTO

COLORAÇÕES USADAS EM MICROBIOLOGIA

Artigo Científico apresentado a ACT – Academia de
Ciência e Tecnologia para a obtenção do grau de
Especialista em Microbiologia Clínica.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2018

COLORAÇÕES USADAS EM MICROBIOLOGIA

COLLECTIONS USED IN MICROBIOLOGY
ANGELO TRENTO¹

Avenida Bahia, 106 – Zona 01, Cianorte, Paraná, Brasil. Cep 87200-181. labmenjesus@hotmail.com

RESUMO

Neste artigo vamos abordar as diferentes técnicas de colorações usadas bacterioscopia em microbiologia, a mais conhecida e utilizada é a coloração de Gram vamos abordar também as técnicas de Coloração de Ziehl-Neelsen, Coloração de Fontana Tribondeau, Coloração de Albert-Laybourn, Coloração de Wirtz-Conklin. Vamos descrever a importância de cada uma dessas técnicas. As bactérias podem ser observadas em duas maneiras, com coloração ou sem coloração sem coloração é o exame a fresco onde os microrganismos são observados vivos. Existem alguns tipos de colorações consideradas simples, diferencial e especial sendo assim abordamos a diferença de cada uma dessas coloração e mostramos a técnica para a utilização das mesmas.

PALAVRAS CHAVES: Bacterioscopia, Gram, Ziehl-Neelsen, Fontana Tribondeau, Albert-Laybourn, Colorações, Wirtz-Conklin.

ABSTRACT

In this article we will address the different techniques of staining used bacterioscopy in microbiology, the best known and used is the Gram staining we will also abort the techniques of Ziehl-Neelsen Coloring, Fontana Tribondeau Coloring, Albert-Laybourn Coloring, Wirtz Coloring -Conklin. Let us describe the importance of each of these techniques. Bacteria can be observed in two ways, with coloration or without staining without staining is the fresh examination where the microorganisms are observed alive. There are some types of stains considered simple, differential and special, so we approach the difference of each of these stains and show the technique for their use.

KEYWORDS: Bacterioscopy, Gram, Ziehl-Neelsen, Fontana Tribondeau, Albert-Laybourn, Coloring, Wirtz-Conklin.

1. INTRODUÇÃO

A identificação de bactérias para a diagnóstico de doenças é extremamente importante para um tratamento mais preciso dos pacientes. No método de bacterioscopia existem duas maneiras para visualização de bactérias com ou sem coloração. No método sem coloração que considerado o exame a fresco que é através da suspensão bacteriana entre lamina e lamínula são observados os microrganismo vivos, essa técnica é para visualização de mobilidade e morfologia das bactérias espiraladas que na coloração podem vir a ficar distorcidas se fixada.

Na preparação da técnica com coloração os microrganismos são coradas após serem mortos pelas interações químicas que na maioria dos casos podem ocorrer com auxílio de calor. Em material fixado e corado a mais vantagens para a identificação do microrganismo, pois a bactérias e células ficam mais visíveis depois de coradas e podem ser transportadas em lâminas sem risco algum. É também como vantagem de diferenciar a células de afinidades distintas aos corante e de morfologia variada.

As bactérias são praticamente incolores não apresentando contraste suficiente, o que dificulta sua visualização. A diferença química entra as bactérias e o meio é que nos permite distingui-las por técnicas de coloração. Na maioria das vezes o corante não reage com o meio externo, tornando-as quando coradas, mais visíveis ao microscópio.

Outra vantagem para a coloração é a utilização da objetiva de imersão na microscopia óptica teremos uma maior amplificação da imagem além de nos permitir o estudo de estruturas da célula bacteriana como: parede celular, endósporos, flagelos e arranjos.

Existem alguns processos que nos permitem corar as bactérias:

- **Coloração simples** – Nessa coloração usamos apenas um corante e nisso baseia-se na diferença química existente entre as bactérias e o meio. Quando coradas, apresentam contraste podendo ser visualizadas com mais clareza. Cujo objetivo é apenas tornar a forma e estrutura básica das células mais visíveis
Corantes comuns em Coloração Simples: Azul de metileno, Cristal violeta, Carbolfucsina.
- **Coloração diferencial** – Nessa coloração normalmente utilizamos mais de um corante além de mordentes e do diferenciador. Como base é a diferença química existente nas diferentes estruturas celulares e conseqüentemente na reação diferencial as variadas bactérias e suas estruturas frente a um determinado corante. Essas coloração tem um valor taxonômico e diagnóstico, são utilizadas para distinguir diferentes tipos de bactérias e estruturas.
- **Coloração especial** – São aquelas utilizadas para corar e identificar partes específicas dos microrganismos como esporos, flagelos ou ainda revelar a presença de cápsulas. Esses são métodos pouco usados na rotina laboratorial.

Sendo assim vamos abordar um pouco de cada coloração utilizada e a técnica utilizada para as seguintes coloração:

- Coloração de Gram
- Coloração de Fontana Tribondeau
- Coloração de Ziehl-Neelsen
- Coloração de Albert-Laybourn
- Coloração de Wirtz-Conklin

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

Por meio de uma revisão de literatura nas bases Medline, Llacs, Pubmed, Google Acadêmico e Scielo foram selecionados 100 artigos onde foram utilizados 21 artigos dos últimos anos, com as palavras chaves: Bacterioscopia, Gram, Ziehl-Neelsen, Fontana Tribondeau, Albert-Laybourn, Colorações, Wirtz-Conklin. Os artigos foram revisados e os principais aspectos são apresentados a seguir.

3. DESENVOLVIMENTO:

3.1 Coloração de Gram

No ano de 1884 surgiu uma coloração chamada de Gram, ela foi criada pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram. Essa criação se deu devido a um processo utilizado na parede celular. A partir desse momento as bactérias passaram a ser analisadas de uma nova forma, e divididas em Gram-positivas e Gram-Negativas (MOREIRA; CARVALHO e FROTA, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde a coloração Gram começou a ser estudada quando esse médico descobriu que colocando as bactérias em contato com cores distintas, ela passava a ter uma nova cor. Assim, com amostras de materiais infectados em dissolução a um solvente poderia ser identificado a taxonomia e várias bactérias, passando a ter grande eficácia nos laboratórios de bacteriologia (MONTES, 2010).

Foi a partir desse momento que o diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis, entre elas a AIDS começaram a ser analisadas, em laboratório, o que deu um novo método investigativo para o Ministério da Saúde (BRASIL, 2001).

A bacterioscopia também é realizada para exames de infecção do trato urinário é uma das infecções bacterianas mais presentes nos adultos “podendo envolver tanto o trato urinário baixo quanto o superior ou ainda ambos. Mais de 50% das mulheres apresentarão um episódio de infecção do trato urinário durante a vida” (ROSSI et. al., 2011, p.01).

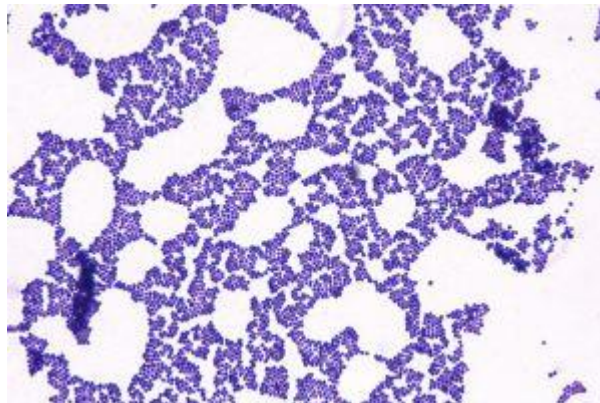
A microscopia tem a finalidade de detectar os elementos insolúveis presentes na urina, que podem ou não ter significado clínico e por isso devem ser tanto identificados quanto quantificados. O aumento da presença de alguns elementos, como leucócitos, hemácias, células e principalmente microrganismos, estão relacionados com casos de infecção do trato urinário (ITU) (STRASINGER, 1998).

Contudo, este exame a fresco, permite apenas a detecção da presença do microrganismo. Para a observação da forma e outras características, como composição química, estrutura, permeabilidade da

parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade, é necessário à realização da bacterioscopia pelo método da coloração de Gram (STRASINGER, 1998)

As bactérias Gram-positivas não se descoram facilmente pelo tratamento com o álcool, por elas possuírem uma espessa parede celular (várias camadas de peptidoglicano) e outros componentes como: ácidos teicóidos, proteínas polissacárides e etc. Sendo assim essas substâncias não são solúveis em álcool, que parece atuar reduzindo a permeabilidade da parede dificultando a saída do citoplasma. Sendo assim as bactérias Gram-positiva permanecem com a cor roxa até o final da técnica de coloração. Reis; Santos (2016, p. 13)

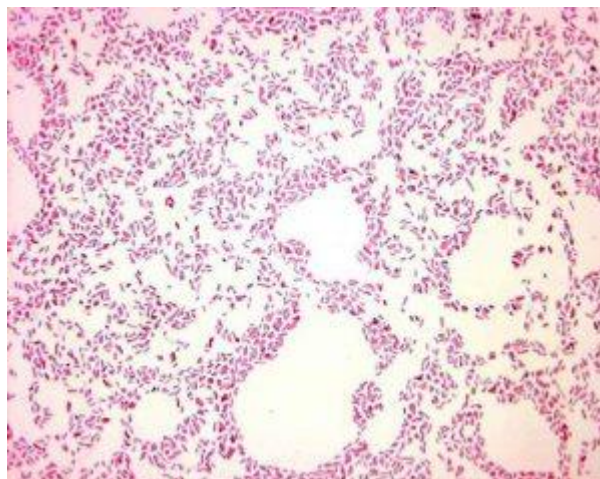
FIGURA 01 - Gram-positiva



FONTE: MONTES (2010, p.04).

As bactérias Gram-negativas são descoradas pelo tratamento com o álcool. Elas possuem uma delgada camada de peptidoglicano e também uma membrana rica em lipídios. Sendo assim o álcool dissolve esses lipídios o que contribui para um aumento da permeabilidade da parede permitindo a remoção do citoplasma. Que por fim as bactérias descoradas pelo álcool, não apresentam contraste que permita sua visualização e são coradas por um corante secundário, a fucsina que coram a cor rosa. (BRASIL, 2001)

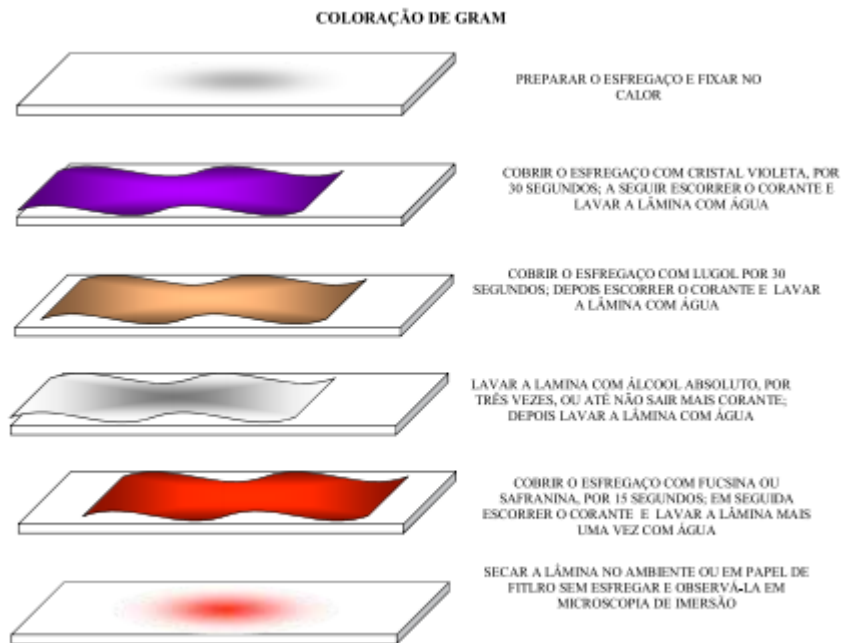
FIGURA 02 - Gram - negativa



FONTE: MONTES (2010, p.04).

3.1.2 Técnica para Coloração de Gram

FIGURA 03: Coloração de Gram



Fonte: Moreira; Carvalho e Frota (2015, p.31).

- Cristal de violeta – é considerado o principal corante para a realização da técnica pois ele cora igual todas as bactérias, atua como corante primário.
- Lugol – tem como função aumentar a afinidade do corante pela célula o que faz com que ela se core mais intensamente
- Álcool Etílico – age como descorante de diferenciador. A utilização do álcool faz com que algumas células se descorem mais facilmente que as outras e isso é o que vai diferenciar as bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas.
- Fucsina – tem a função de contraste atua como corante secundário. É o corante que dá as células que foram descordadas uma cor diferente daquelas que mantem a cor do corante principal. Esse corante é o que defini a cor das bactérias Gram-Negativas. Moura (2008)

3.1.3 Solução:

- Cristal Violeta: Cristal Violeta (violeta de genciana) 1,0g, Álcool 95° 10ml, Fenol fundido 2,0g, H₂O destilada 100ml
- Lugol: Iodo metálico 1,0g, Iodeto de potássop 2,0g, H₂O destilada 300ml
- Álcool etílico: A técnica preconizada pelo Ministério da Saúde sugere a utilização de álcool 99,5°GL

- Fucsina: Fucsina básica 1,0g, Álcool absoluto (etanol) 10ml OBS: Usa-se diluída esta solução na diluição 1/1.(Moreira; Carvalho e Frota, 2015)

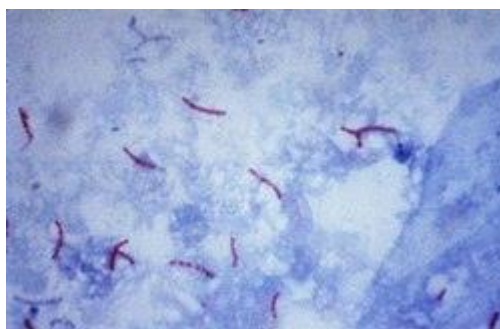
3.2 Coloração de ZIEHL- NEELSEN

Trata-se de uma técnica de coloração de bactérias mais agressivas que a técnica de Gram, sendo de grande importância em medicina humana e animal. No gênero *Mycobacterium* incluem-se os agentes da tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium*) e da lepra (*M. leprae*), além de outras espécies, algumas saprófitas e outras de patogenicidade peculiar. (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2006)

Sendo suas características do gênero *Aerobiose* estrita, reprodução lenta, mesmo em condições ótimas (seu período de duplicação é de 12 a 18 horas enquanto outras bactérias podem se duplicar em 20 minutos); - Reações tintoriais próprias que as fazem conhecidas com “álcool-ácido-resistentes” (B.A.A.R.) evidenciadas pela coloração de Ziehl-Neelsen. Coram-se pela mistura fucsina mais ácido fênico aquecido, que penetra no citoplasma e resistem à descoloração com uma mistura de ácido e álcool. (TORTORA, 2000)

Os meios mais usados são: (Lowenstein-Jensen e Petragani a base de ovo), o crescimento acontece somente após 12 a 15 dias, mas a cultura deve se observar por até 6 a 8 semanas. Se contaminado com outra bactéria antes da sementeira, deve-se proceder à descontaminação. O isolamento permite sua triplicação que pelo aspecto colônia desenvolvidas quer por provas bioquímicas. Também o aspecto microscópico da colônia é importante (fator corda). (WILSON, 2011)

Representação *Mycobacterium tuberculosis* corado com a técnica de Ziehl-Neelsen:



(Ministério da Saúde 2005)

3.2.1 Interpretação

Os B.A.A.R. apresentam-se como bastonetes finos, corados em vermelho, sobre fundo corado em azul. O resultado do exame de escarro corado pelo Ziehl-Neelsen pode ser dado conforme a seguinte tabela do Serviço Nacional de Tuberculose.

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
Negativo	Ausência de BAAR em 100 campos microscópicos
Exame a ser repetido	1 a 2 BAAR em 100 campos microscópicos
Positivo	Menos de 10 BAAR em 100 campos microscópicos
(+)	1 a 10 BAAR em 10 campos microscópicos
(++)	11 a 100 BAAR em 10 campos microscópicos
(+++)	Mais de 100 BAAR em 10 campos microscópicos
(++++)	

A bacterioscopia do escarro pela coloração de Ziehl-Neelsen é um método simples, porém de extrema valia no diagnóstico da tuberculose pulmonar. Este método é largamente utilizado para a detecção de novos casos da doença. Vale ressaltar que o método apresenta apenas valor presuntivo e não de certeza, isto é, outras espécies de micobactérias podem se corar. (YOUNG,2006)

Assim o resultado do B.A.A.R. positivo num escarro implica na ideia de que se trata do M. tuberculosis com margem grande de segurança, mas não deve ser encarado como um valor absoluto. Além do escarro, outros materiais biológicos podem ser usados para o diagnóstico da tuberculose pulmonar (lavado brônquico, lavado gástrico, “swab” da laringe) e de outros órgãos (urina, líquor, peças de biópsia, etc.). (ALMEIDA, 2005)

3.2.2 Método para coloração:

- Cobrir a lâmina, previamente fixada pelo calor, com fucsina fenicada. Aquecer até a emissão de vapores, sem deixar o corante secar, por 3 a 5 minutos;
- Lavar em água corrente; - Em seguida descorar completamente com álcool-ácido;
- Lavar em água corrente novamente;
- Contra corar com azul de metileno por 30 segundos; - Lavar em água corrente novamente; examinar a lâmina ao microscópio com objetiva de imersão.

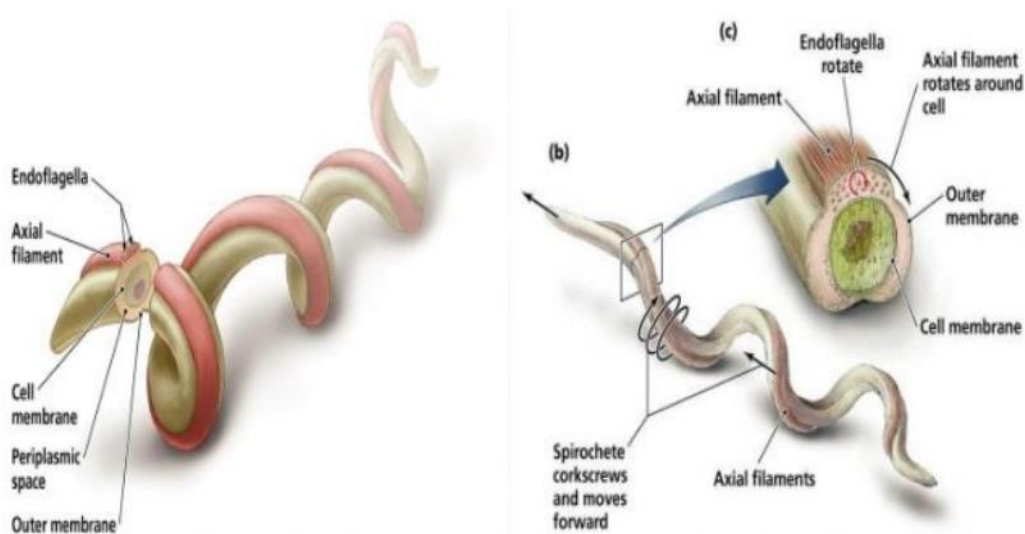
3.2.3 Solução utilizada para o método:

- Fucsina: Dissolver 3g de fucsina básica em 10 ml de etanol 90%-95%, em seguida adicionar 90 ml de uma solução aquosa de fenol a 5%
- Álcool – ácido: Adicionar 3 ml de HCl concentrado em 97 ml de etanol a 90%-95%.
- Azul de Metileno: Dissolver 0.3 g de azul de metileno em 100 ml de água destilada.

3.3 Coloração de Fontana Tribondeau

É considerado um método de coloração não verdadeiro esse método foi desenvolvido em 1920. É uma técnica de impregnação pela prata usada para auxiliar na visualização de bactérias espiraladas as quais são muito finas e se coram forma insuficiente pelo Gram como por ex: Leptospira interrogans e treponemas. Na realização dessa técnica as espiroquetas aparecerem na cor marrom-escuro ou negra em um fundo amarelo-castanho ou marrom claro. (ALMEIDA, 2005)

Espiroquetas são Gram-Negativos em forma de espiral eles são únicos na morfologia e locomoção, o seu tamanho é medido por medição do seu comprimento e largura de modo geral é de 5 a 500 microns de comprimento e de 0,1 a 3 microns de largura, possuem periplasma flagelos endo-cruzamento. Endo-flagelos podem ser duas em números de 100 esses flagelos são enrolados em torno das células protoplastos helicoidais entre membrana externa. Essas espiroquetas são organismos extremamente sensíveis na técnica especial. (FERREIRA,2005)



3.3.1 Método de Coloração

A partir de esfregaços em lâminas homogêneo, delgado e fixado

- Cobrir o esfregaço com a solução fixadora (renová-la 3x, por 30 segundos).
- Cobrir com solução mordente, aquecendo a lâmina até emitir vapores. Aguardar 30 segundos e lavar em água corrente.
- Tratar pela solução impregnadora de prata (nitrato de prata amoniacal), aquecendo ligeiramente a lâmina até a emissão de vapores, deixando agir por 30 segundos (a preparação toma a cor marrom).
- Secar ao ar. Examinar a lâmina ao microscópio com a objetiva de imersão

3.3.2 Solução de Coloração

- Líquido de Ruge (Fixador): Ácido acético glacial 1 ml, Formalina 40% 2ml, Água destilada 100ml
- Mordente: Água tânico 5g, Ácido fênico(fundido) 1ml, Água destilada 100ml.
- Nitrato de Prata Amoniacal (solução impregnadora): Nitrato de prata 5g, Água destilada 100ml

3.4 Coloração de Albert-Laybourn

Inicialmente foi sugerida por Henry Albert, em 1920, e modificada por Ross Laybourn, em 1924. Baseia-se no fato de algumas bactérias apresentarem corpúsculos citoplasmáticos localizados nas regiões polares corpúsculos metacromáticos ou corpúsculos de Babes Ernst, que se coram pelo Lugol forte (de cor marrom), se evidenciando, em contraste com o corpo bacilar, que se cora em verde-azulado pela solução de Laybourn. (BATISTA, 2005)

Tais características são observadas nas corinebactérias e sua presença é associada aos sintomas clínicos característicos da difteria, o que possibilita um diagnóstico presuntivo da doença, pela microscopia ótica.

O método é auxiliar no diagnóstico da difteria. Seu diagnóstico é geralmente clínico, mas a pesquisa de bacilos metacromáticos cuidadosamente coletados a partir da face anterior da pseudomembrana pode ser um importante auxiliar diagnóstico. O cultivo de corinebactérias é possível, mas seu uso clínico é bastante reduzido. O exame direto de esfregaço de naso e orofaringe continua é padrão ouro para triagem de infecção pelo *Corynebacterium diphtheriae*. (JAWETZ, etal. 2000)

Indicações: Método auxiliar no diagnóstico da difteria. Interpretação clínica: Sugere positividade a presença de bacilos gram-positivos pleomorfos, em grande número (predominância), com morfologia e distribuição características.

A difteria é uma doença infecciosa causada por uma bactéria conhecida como *Corynebacterium diphtheriae*, transmitida de pessoa para pessoa por meio das vias respiratórias ou através de contato físico. As bactérias formam placas amareladas que se alojam nas amígdalas, laringe, faringe, nariz e até mesmo na conjuntiva e na pele.

A doença pode ser prevenida através da vacinação. A difteria afeta mais crianças do que adultos. Apesar de ser mais comum nos mais jovens, a mortalidade da doença afeta de 5 a 10% das crianças e 20% adultos com mais de 40 anos de idade.

3.4.1 Método de Albert-Laybourn

- Cobrir o esfregaço por 3 a 5 minutos, com a solução de Albert-Laybourn.
- Escorrer (sem lavar).
- Cobrir com solução Lugol forte, por aproximadamente 2 minutos.
- Examinar a lâmina ao microscópio com a objetiva de imersão.

3.4.2 Soluções para o método

- Solução de Albert-Laybourn: Azul de toluidina 0,15 g, Verde de malaquita 0,20 g, Ácido acético glacial 1 mL, Álcool 95° 2 mL, Água destilada 100 mL
- Solução de Lugol Forte: Iodo metálico 2,0 g, Iodeto de potássio 3,0 g, Água destilada 300 mL, Guardar em frasco âmbar ao abrigo da luz.

3.4.3 Representação *CORYNEBACTERIUM*:

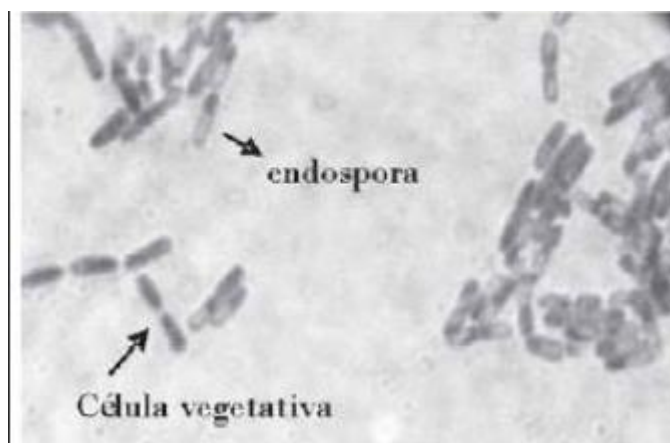


3.5 Coloração de Wirtz-Conklin

A esporulação, processo pelo qual alguns gêneros de bactérias formam esporos. Ela ocorre quando estas bactérias estão face a situações críticas para sua sobrevivência, ou seja, as condições ambientais são adversas para o crescimento bacteriano. De maneira geral, isto ocorre quando há falta de nutrientes, como carbono ou nitrogênio. (ANVISA,2012)

Os esporos apresentam-se sob a forma de corpúsculos esféricos ou ovoides, livres ou no interior da bactéria. Formam-se pela invaginação de uma dupla camada de membrana celular, que se fecha para envolver um cromossoma e uma pequena quantidade de citoplasma, garantindo a sobrevivência da espécie. Esta camada é responsável pela resistência à coloração e ao ataque dos agentes físicos e químicos da esterilização e desinfecção. Por isso que pra se corar os esporos é necessário um tempo prolongado de exposição ao corante (verde malaquita), associado ao aquecimento, o que permite o rompimento desta barreira obtendo-se, então, o esporo corado em verde intenso. São características comuns aos esporos: decréscimo na quantidade total de água em comparação com o estado vegetativo, retroatividade, alta resistência a condições ambientais adversas, habilidade de germinar e produzir células vegetativas após longos períodos de estocagem.(AMABIS,2004)

Na fase esporulada, as bactérias não realizam atividade Biosintética e reduzem sua atividade respiratória. As bactérias podem permanecer viáveis na forma de esporos durante anos, se mantidos a temperaturas usuais e em estado seco. (BLACK,2002)



3.5.1 Método para coloração de Esporos WIRTZ-CONKLIN

- A partir de esfregaços em lâminas homogêneo, delgado e fixado.
- Cobrir o esfregaço com o corante verde malaquita.
- Aproximar da chama até que desprenda vapor, sem deixar que o corante ferva. Afastar do fogo e, após 1 a 2 minutos, repetir a operação por 3 a 4 vezes.
- Lavar suavemente com água, evitando o choque térmico, que poderá quebrar a lâmina.
- Adicionar a solução de safranina por 30 segundos, lavar e secar.
- Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

3.5.2 Soluções utilizadas

- Solução A: Verde malaquita a 5% Verde malaquita 2,5 g, Água destilada 50mL, Misturar e deixar em repouso durante uma noite para dissolver.
- Solução B: Safranina, B.1 Solução estoque Safranina 50 g, Etanol 95% 2000mL, B.2 Solução de trabalho, Solução estoque de Safranina (B.1) 300 mL, Água destilada 2700 MI

4.0 Considerações finais

Portanto conclui-se que a Microbiologia é de grande importância para o diagnóstico de doenças, e para tratamento dos paciente. Pois de acordo com a morfologia das bactérias é possível obter, resultados satisfatórios.

Sendo este um assunto importante para os estudiosos e também para a sociedade como um todo, já que a infecção do trato urinário e outra patologias são nem comuns entre a população.

Foi possível constatar que para analisar o material coletado terão que passar por alguns procedimentos, como o esfregaço e a dissolução de alguns solventes como descrito no trabalho, sendo este utilizado para caso específico.

A coloração mais utilizada para Análises Clínicas é a coloração de Gram onde é definido bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas que após analisado por um profissional capacitado é iniciado o tratamento devido a indicações medicas.

5.0 Referências:

- BRASIL. Técnica de Coloração de Gram. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 2001.
- MONTES, Ricardo. 2010. Observação de bactérias usando a Cloração de Gram. Disponível em: http://ricardomontes.weebly.com/uploads/3/0/9/4/3094204/colorao_gram.pdf. Acesso em 25 de Out. de 2018.
- Moreira, José Luciano Bezerra; CARVALHO, Cibele Barreto Mano de; FROTA, Cristiane Cunha. Visualização bacteriana e colorações. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015.
- Reis, Angela Adamski da Silva; Santos, Rodrigo da Silva. Microbiologia básica. Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser, 2016.
- ROSSI Patrícia de et. al. Infecção urinária não complicada na mulher: diagnóstico. 2011. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.57 no.3 São Paulo Mai/Jun de 2011.
- SIMÃO, Mariângela Batista Galvão. Técnica de Coloração em Gram. 2013. Disponível em: https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22130/mod_resource/content/2/Tecnicas%20de%20Coloracao%20de%20Gram.pdf. Acesso em 25 de Out. de 2018.
- STRASINGER, S. K. Uroanálise & fluidos biológicos. 3.ed. São Paulo: Premier, 1998.
- Moura, R. A – Técnicas de laboratório – 3. Ed – São Paulo: Editora Atheneu, 2008.
- Brooks GF, Butel JS, Morse AS. *Microbiologia médica*. 20ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006
- TORTORA G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000
- WILSON, B. A. et al. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 3. ed. Washington DC: ASM Press, 2011
- YOUNG, K. The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biol. Rev.*, v. 70, n. 3, 2006
- Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3ªed. Edição comemorativa Rio de Janeiro, 2005
- ALMEIDA EA, et al., Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema de diagnóstico automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. *J. bras. pneumol.* vol.31 no.3 São Paulo May/June 2005
- Ferreira AAF, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MAF, Accioly H, Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Rev Bras Epidemiol.* 2005;
- BATISTA, R. S. ; GOMES, A. P. Antimicrobianos - Guia Prático. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2005.
- BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC Nº 29, 01 de junho de 2012. Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Brasília, 2012.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. Biologia. 2ª série. V. 2. São Paulo: Moderna, 2004.
- BLACK, J. G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Microbiologia Médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000