



Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde

**Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de
Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar
Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004**

- Versão Preliminar -

Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SEPN 515, Edifício Omega. Bloco B, Brasília (DF), CEP 70770-502

Internet: www.anvisa.gov.br

Gerência-Geral de Tecnologia em Serviços e Saúde

Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos

É permitida a reprodução total desta obra, desde que citada a fonte.

1. ed. 2004. Tiragem: 200 exemplares em CD

Edição nova com modificações no conteúdo e no título, tendo como base o Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica publicado em 2000.

1. Infecção Hospitalar – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Brasil. ANVISA Ministério da Saúde.

Coordenação do Projeto

Adelia Aparecida Marçal dos Santos – Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos / ANVISA / MS

Autor

Carlos Emílio Levy - Laboratório de Microbiologia - Centro Infantil Boldrini / Campinas SP

Colaboradores

Angela von Nowakowski - Serviço de Microbiologia Clínica do Hospital das Clínicas - UNICAMP / Campinas SP

Caio Marcio Figueiredo Mendes - Universidade de São Paulo, Laboratório Fleury / São Paulo SP

Carlos Emílio Levy - Laboratório de Microbiologia - Centro Infantil Boldrini / Campinas SP

Carmen Oplustil - Laboratorio Fleury / São Paulo SP

Cássia Maria Zoccoli - Farmacêutica Bioquímica

Cláudia Maria Leite Maffei - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP / Ribeirão Preto SP

Elza Masae Mamizuka - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP / São Paulo SP

Emerson Danguy Cavassin - Laboratório de Microbiologia, Hospital das Clínicas da UE / Londrina PR

Flávia Rossi - Médica Microbiologista Clínica

Igor Mimica - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa / São Paulo SP

Helena Petridis – Consultora técnica da ANVISA

Lycia Mara Jenne Mimica - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa / São Paulo SP

Marcia de Souza Carvalho Melhem - Instituto Adolfo Lutz / São Paulo SP

Maria Carmen Gonçalves Lopes - Laboratório de Microbiologia, Centro Infantil Boldrini / Campinas SP

Marines Dalla Valle Martino - Hospital Israelita Albert Einstein / São Paulo SP

Nilton Lincopan – Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Rosângela Aparecida Mendes Silva - Laboratório de Microbiologia, Centro Infantil Boldrini / Campinas SP

Revisores

Claude André Solari - Sociedade Brasileira de Microbiologia / São Paulo SP

Helena Petridis – Consultora técnica ANVISA

José Carlos Serufo - Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Faculdade de Medicina da UFMG

Lauro Santos Filho - Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB / João Pessoa PB

Maria Rita Elmor – Laboratório de Microbiologia do Hospital Sírio Libanês / São Paulo SP

Pedro Bertolini - Professor aposentado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / USP

Sílvia Figueiredo Costa – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

CONTEÚDO GERAL

Módulo I

Principais Síndromes Infecciosas

1. Infecções do Trato Urinário
2. Infecções de Ossos e Articulações
3. Infecções de Pele e Tecido Subcutâneo
4. Infecções Intestinais
5. Infecções Abdominais
6. Infecções do Sistema Nervoso Central
7. Infecções Sistêmicas
8. Infecções Genitais
9. Infecções do Trato Respiratório Superior
10. Infecções do Trato Respiratório Inferior
11. Referências Bibliográficas

Módulo II

Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica

1. Regulamento técnico para laboratórios clínicos
2. Requisitos básicos para laboratório de microbiologia
3. Classificação dos laboratórios segundo o nível de biossegurança
4. Laboratórios NB-1, NB-2 e NB-3
5. Precauções quanto à contaminação
6. Controle de qualidade no laboratório
7. Referências Bibliográficas

Módulo III

Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica

1. Requisição de exames microbiológicos
2. Coleta, transporte e conservação de amostra
3. Microscopia e coloração
4. Semeadura em meios de cultura
5. Identificação
6. Manutenção e Estoque de Cultura
7. Referências Bibliográficas

Módulo IV

Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos

1. Introdução
2. Meios de cultura para transporte e conservação
3. Meios para crescimento e isolamento
4. Meios comerciais para provas de identificação
5. Fórmulas e produtos para provas de identificação
6. Discos para identificação
7. Meios para teste de sensibilidade aos antimicrobianos
8. Referências Bibliográficas

Módulo V

Detecção e identificação das bactérias de importância médica

1. Estafilococos, Streptococos, Enterococos e outros Gram positivos
2. Neisserias
3. Enterobactérias
4. bastonetes não fermentadores
5. Bacilos curvos ou espiralados
6. Bacilos Gram positivos
7. Fastidiosos
8. Anaeróbios
9. Interpretação de resultados e laudos
10. Referências Bibliográficas

Módulo VI

Detecção e identificação das micobactérias de importância médica

1. Introdução
2. Coleta de amostras
3. Processamento de amostras
4. Cultura para Isolamento de micobactérias
5. Identificação das diferentes espécies de micobactérias
6. Anexos
7. Referências Bibliográficas

Módulo VII

Detecção e identificação dos fungos de importância médica

1. Introdução
2. Coleta e transporte de amostras
3. Processamento de amostras
4. Identificação de fungos
5. Descrição das principais micoses
6. Referências Bibliográficas

INTRODUÇÃO

LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA

O objetivo do laboratório de microbiologia não é apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas sim, indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos microrganismos que estão interagindo com o homem. Com essas informações, a equipe de saúde é capaz de definir quais microrganismos podem ser responsáveis pelo quadro clínico do paciente e assim, propor um tratamento mais adequado. No entanto, para alcançar esses objetivos, os laboratórios de microbiologia devem possuir estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a flora normal, reconhecer os contaminantes, identificar microrganismos cujo tratamento beneficia o paciente, identificar microrganismos com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, racionalizar no uso de antimicrobianos, realizar o transporte rápido das amostras e o relato dos resultados e manter uma educação médica contínua em relação aos aspectos da infecção hospitalar.

A primeira edição do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar teve como proposta padronizar as técnicas microbiológicas consideradas fundamentais na rotina e que pudessem dar respaldo às atividades das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar. Se, por um lado, sua virtude foi a simplicidade e objetividade no desenvolvimento dos temas, as suas limitações e a rápida evolução do conhecimento nesta área logo reclamaram sua atualização.

Estamos, agora, diante da oportunidade de resgatar algumas falhas daquela primeira edição, procurando ampliar e aprofundar temas considerados essenciais, contando com um seletivo e conceituado corpo editorial e de colaboradores. Nossa expectativa é de que os laboratórios de microbiologia, a partir das bases oferecidas por este Manual, possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada unidade hospitalar.

Não tivemos a pretensão de alcançar o conteúdo e a profundidade dos manuais-textos de microbiologia tradicionalmente consultados e que também nos serviram de referência, mas sim, de servir como manual de bancada de técnicas consagradas, procedimentos básicos padronizados e informações atualizadas de utilidade no meio hospitalar.

Esta edição revisada e ampliada foi programada em **10 módulos**, abrangendo os seguintes temas:

Módulo I	Principais síndromes infecciosas
Módulo II	Segurança e controle de qualidade no laboratório clínico
Módulo III	Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica
Módulo IV	Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos
Módulo V	Deteção e identificação bactérias de importância médica
Módulo VI	Deteção e identificação micobactérias de importância médica

- Módulo VII** Detecção e identificação de fungos de importância médica
- Módulo VIII** Detecção e identificação de vírus de importância médica (em produção)
- Módulo IX** Principais métodos de detecção da resistência no Laboratório Clínico (em produção)
- Módulo X** Laboratório de Microbiologia e sua interação com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (em produção)

Esperamos assim atender à grande maioria de microbiologistas que, afastados dos grandes centros, não têm acesso a informações atualizadas na área de Microbiologia e que, melhor capacitados, possam estar à altura das expectativas das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar, oferecendo um suporte técnico atualizado e mais eficiente.

INTRODUÇÃO A INFECÇÃO HOSPITALAR

Uma das maiores preocupações na área de saúde é a alta incidência de infecção hospitalar ou nosocomial, isto é, infecção adquirida em ambientes hospitalares durante a internação ou após a alta do paciente, quando este esteve hospitalizado ou passou por procedimentos médicos.

A infecção hospitalar atinge o mundo todo e representa uma das causas de morte em pacientes hospitalizados. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a taxa média de infecção hospitalar é de cerca 15%, ao passo que nos EUA e na Europa é de 10%. Cabe lembrar, no entanto, que o índice de infecção hospitalar varia significativamente, pois está diretamente relacionada com o nível de atendimento e complexidade de cada hospital.

Diferentes microrganismos como bactérias, fungos, e vírus causam infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se destaca é o das bactérias que constituem a flora humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis devido sua baixa virulência, mas que podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido – denominadas assim de bactérias oportunistas.

O segundo grupo de importância médica nas infecções hospitalares são os fungos, sendo o *Candida albicans* e o *Aspergillus* os patógenos mais frequentes. Os fungos são responsáveis por aproximadamente 8% das infecções hospitalares. Dentre as viroses, o vírus da hepatite B e C, enterovirose e viroses associadas com pneumonia hospitalar são comumente registrados. As viroses representam por volta de 5% das infecções.

Geralmente os sítios de infecção hospitalar mais frequentemente atingidos são o trato urinário, feridas cirúrgicas e trato respiratório. Os patógenos que lideram no ranking das infecções hospitalares estão descritos na tabela abaixo.

Agentes mais comuns de infecções nosocomiais

Patógeno	Sítios comuns de isolamento do patógeno
Bactérias Gram negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, queimaduras
<i>Klebsiella sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Proteus sp</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Serratia sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
Bactérias Gram positivas	
<i>Streptococcus sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
Fungi	
<i>Candida albicans</i>	Trato urinário, sangue
outros	Trato urinário, sangue, trato respiratório

O ambiente hospitalar é inevitavelmente um grande reservatório de patógenos virulentos e oportunistas, de modo que as infecções hospitalares podem ser adquiridas não apenas por pacientes, que apresentam maior susceptibilidade, mas também, embora menos freqüentemente, por visitantes e funcionários do próprio hospital.

Os patógenos implicados nas infecções hospitalares são transmitidos ao indivíduo tanto via endógena, ou seja, pela própria flora do paciente quanto pela via exógena. Esta última inclui veículos como mãos, secreção salivar, fluidos corpóreos, ar e materiais contaminados, como por exemplo, equipamentos e instrumentos utilizados em procedimentos médicos. Muitos destes procedimentos são invasivos, isto é, penetram as barreiras de proteção do corpo humano, de modo a elevar o risco de infecção (vide Tabela)

Os principais fatores que influenciam a aquisição de uma infecção são:

- status imunológico
- idade (recém-nascidos e idosos são mais vulneráveis)
- uso abusivo de antibióticos
- procedimentos médicos, em particular, os invasivos
- imunossupressão
- falhas nos procedimentos de controle de infecção

Exemplos de microrganismos da flora normal humana

Pele

Staphylococcus
Micrococcus
Propionibacterium
Corynebacterium
Streptococcus
Malassezia
Pityrosporum

Olhos

Staphylococcus
Streptococcus
Neisseria

Cavidade oral

Lactobacillus
Neisseria
Streptococcus
Fusobacterium
Actinomyces
Treponema
Bacteroides

Trato respiratório

Staphylococcus
Corynebacterium
Streptococcus
Hemophilus
Neisseria
Branhamella

Trato Digestivo

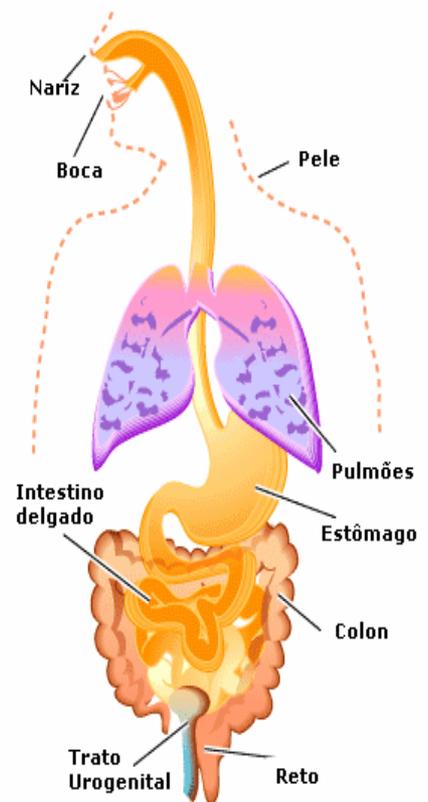
Bacteroides
Lactobacillus
Enterococcus
Escherichia coli
Proteus
Klebsiella
Enterobacter
Bifidobacterium
Citrobacter
Fusobacterium
spirochetes

Trato Urogenital

Streptococcus
Bacteroides
Mycobacterium
Neisseria
Enterobacter
Clostridium
Lactobacillus
Candida
Trichomonas

Ouvido

Staphylococcus
Corynebacterium



Procedimentos médicos comuns associados com infecções nosocomiais

Procedimento	Doença	Patógeno
Cateterização urinária	Cistite	Bacilos gram negativos, enterococos
Cirurgia	Feridas, septicemia	<i>Staphylococcus</i> , bacilo gram negativos, bacteróides
Terapia intravenosa	Infecção no local de injeção, septicemia	<i>Staphylococcus</i> , <i>klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Candida</i>
Intubação respiratória	pneumonia	<i>Pseudomonas</i> , <i>klebsiella</i> , <i>Serratia</i>
Díalise renal	Sepse, reação pirogênica	Vírus da hepatite B, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas</i>

Principais Síndromes Infecciosas

Módulo I

ÍNDICE

1. Infecções do trato urinário	1
Introdução	1
Patogênese.....	2
Epidemiologia e fatores de risco.....	3
Sinais e sintomas clínicos.....	3
Diagnóstico laboratorial	5
2. Infecções de ossos e articulações	9
Introdução	9
Microrganismos mais frequentes	9
Coleta e transporte do material	10
Processamento de amostra	10
3. Infecções da pele e tecido subcutâneo	12
Introdução	12
Lesões eritematosas e superficiais: aspectos clínicos e diagnóstico.....	12
Ulcerações e nódulos: aspectos clínicos e diagnóstico	14
Fístulas e queimados: aspectos clínicos e diagnóstico.....	15
Feridas cirúrgicas: aspectos clínicos e diagnóstico	17
Infecções complicadas e lesões causadas por mordedura: aspectos clínicos e diagnóstico.....	18
4. Infecções intestinais	21
Introdução	21
Principais causas infecciosas de desintéria.....	22
Associações entre os aspectos clínicos e os agentes etiológicos	24
Diagnóstico laboratorial	27
Relatório de resultados.....	28
5. Infecções abdominais	30
Agentes microbianos mais frequentes	30
Coleta e transporte do material	30
Processamento das amostras	30
6. Infecções do sistema nervoso central	32
Introdução	32
Dados epidemiológicos e etiologia de processos infecciosos do snc.....	33
Diagnóstico laboratorial	35
7. Infecções sistêmicas	38
Introdução	38
Fatores de risco para bacteremia e fungemia	38
Diagnóstico em hemoculturas.....	39
Infecção relacionada a cateter vascular.....	41
8. Infecções genitais	43
Introdução	43
Candidíase vulvo-vaginal	43
Tricomoníase	44
Vaginose bacteriana.....	45
Infecção gonocócica	46
Infecções por chlamydia trachomatis	48
Infecções por <i>mycoplasma</i> spp.	49
Outras infecções genitais e seus patógenos	50
9. Infecções do trato respiratório superior	51
Introdução	51
Quadro clínico, agentes etiológicos e diagnóstico laboratorial	51
10. Infecções do trato respiratório inferior	53
Pneumonia da comunidade	53
Pneumonia hospitalar.....	54
Diagnóstico laboratorial das pneumonias.....	56
Pacientes neutropênicos e imunossuprimidos	60
11. Referências bibliográficas	62

1. INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as doenças infecciosas mais comuns na prática clínica, particularmente em crianças, adultos jovens e mulheres sexualmente ativas, sendo apenas menos frequente que as do trato respiratório. No meio hospitalar são as mais frequentes entre as infecções nosocomiais em todo o mundo. Do ponto de vista prático, por convenção, define-se como ITU tanto as infecções do trato urinário baixo (cistites) e como as do trato urinário alto (pielonefrites).

Quanto à topografia, as ITUs são divididas em:

- Altas - que envolvem o parênquima renal (pielonefrite) ou ureteres (ureterites)
- Baixas - que envolvem a bexiga (cistite) a uretra (uretrite), e nos homens, a próstata (prostatite) e o epidídimo (epididimite).

Significado de bacteriúria: A investigação microbiológica de suspeita da infecção urinária pela urocultura, permitiu identificar dois grupos de pacientes com bacteriúria ≥ 100.000 bactérias por ml de urina:

- Sintomáticos, e portanto com infecção urinária
- Assintomáticos, definidos como portadores de bacteriúria assintomática

A importância em diferenciar estes dois grupos é importante tanto do ponto de vista de conduta como prognóstico. Para o primeiro grupo há a necessidade de tratamento imediato, para o segundo grupo de pacientes, comumente constituído de meninas em idade escolar (1 a 2%) e de mulheres jovens com vida sexual ativa (5%), existe um risco maior de desenvolver ITU no futuro. Não implicando necessariamente em tratamento, pois cerca de 25% delas passam espontaneamente a ter uroculturas negativas no prazo de um ano. Um grupo importante identificado com bacteriúria assintomática que merece seguimento pelo elevado risco de ITU são as gestantes, idosos e pacientes cateterizados.

Quanto à evolução as ITUs podem limitar-se a episódio único ou isolado, a recidiva, a reinfeção e a infecção urinária crônica:

- Episódio único ou isolado: ocorre uma única vez e resolve habitualmente pelo uso de antibioticoterapia. Um segundo episódio isolado, pode ocorrer sem relação temporal com o anterior. Entre 10 a 20% das mulheres irão apresentar no decorrer da vida pelo menos um episódio de infecção urinária.
- Recidiva ou recaída de ITU – em consequência a falha no tratamento o mesmo microrganismo isolado previamente persiste no trato urinário, causando infecção ou bacteriúria assintomática. A persistência do mesmo microrganismo por meses ou anos, leva a infecção urinária crônica.
- Reinfeção - é a ocorrência de um novo episódio de ITU, sem relação com o evento anterior, causado por outro microrganismo, exceto que pela origem e frequência do agente etiológico que coloniza a região perineal, pode ser atribuída à mesma espécie bacteriana (ex: E.coli). Episódios repetidos de reinfeção não devem ser confundidos com infecção urinária crônica.
- ITU crônica representa a persistência do mesmo microrganismo por meses ou anos com recidivas após tratamento, no caso de pielonefrite crônica, há associação com comprometimento da pelve e parênquima renal.
- ITU recorrente: ocasionalmente a recorrência é pela persistência do mesmo agente (recidiva), mas em cerca de 90% dos episódios ocorre por reinfeção, com meses de intervalo entre eles. Cerca de 20% das jovens após o episódio inicial de cistite tem infecções recorrentes, que caracterizam bem este grupo. Dois ou mais episódios no período de 6 meses ou três ou mais no período de um ano definem as infecções recorrentes na mulher. Nos homens, a ITU recorrente é definida quando ocorrem dois ou mais episódios de ITU em um período de até 3 anos, lembrando a frequente associação com prostatite bacteriana crônica, nos pacientes sem fatores predisponentes.

Quanto à presença de fatores predisponentes ou agravantes as ITUs são classificadas em dois grupos:

- ITU não complicada: ocorre primariamente em mulheres jovens sexualmente ativas sem anormalidade anatômica ou funcional do aparelho genitourinário.
- ITU complicada: ocorre em indivíduos que já possuem alguma anormalidade estrutural ou funcional do processo de diurese, presença de cálculos renais ou prostáticos, doenças subjacentes em que haja predisposição a infecção renal (diabetes mellitus, anemia falciforme, doença policística renal, transplante renal) ou na vigência de cateterismo vesical, instrumentação ou procedimentos cirúrgicos do trato urinário. Pelo maior risco, as ITUs em crianças, gestantes, homens e infecções do trato urinário alto são consideradas infecções complicadas.

PATOGÊNESE

As três possibilidades de um microrganismo alcançar o trato urinário e causar infecção são:

Via ascendente: o microrganismo poderá atingir através da uretra, a bexiga, ureter e o rim. Esta via é a mais freqüente, principalmente em mulheres (pela menor extensão da uretra) e em pacientes submetidos à instrumentação do trato urinário.

Via hematogênica: ocorre devido a intensa vascularização do rim podendo o mesmo ser comprometido em qualquer infecção sistêmica; é a via de eleição para ITU(s) por alguns microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma spp.*, sendo também a principal via das ITU(s) em neonatos.

Via linfática: é rara embora haja a possibilidade de microrganismos alcançarem o rim pelas conexões linfáticas entre o intestino e o rim e/ou entre o trato urinário inferior e superior.

Após o microrganismo atingir o trato urinário poderá ocorrer ou não infecção na dependência dos seguintes fatores:

Adequação dos mecanismos de defesa do hospedeiro

- Propriedades antibacterianas da urina (elevada osmolalidade e baixo ph) e da mucosa do trato urinário (citocinas, mecanismos antiaderência).
- Efeito mecânico da micção.
- Resposta imune e inflamatória.
- Integridade anatômica e funcional das vias urinárias.
- Tamanho do inóculo (quanto maior o inóculo que alcança o rim, maior a chance de infecção). A medula renal é altamente susceptível a infecção por baixas contagens bacterianas, ocorrendo o inverso no córtex renal.

Virulência do microrganismo

- Aderência às células uroepiteliais e vaginais
- Resistência à atividade bactericida do soro
- Produção de hemolisina e fator citotóxico necrotizante tipo i.

Nos pacientes com cateterismo vesical, os microrganismos atingem a bexiga através de três caminhos:

- no momento da inserção do cateter
- através da luz do cateter
- através da interface mucosa-cateter

Por outro lado, os fatores envolvidos na fisiopatogênese das infecções urinárias associadas ao uso de cateteres vesicais são:

- fenômenos inflamatórios locais (corpo estranho).
- eliminação dos mecanismos habituais de defesa (esvaziamento incompleto da bexiga, alterações da imunidade local, via aberta de passagem até a bexiga).
- obstrução mecânica das glândulas periuretrais (facilitando quadros de uretrites e epididimite). Nos pacientes com prostatite ou epididimite, os microrganismos atuam, principalmente, através do refluxo da urina infectada nos ductos prostáticos e ejaculatórios.

EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

As ITUs podem atingir todas as faixas etárias. A bacteriúria pode variar de 0,1 a 1,9% dos neonatos a termo, alcançando 10% nos prematuros, sendo a incidência maior nos meninos até os três meses de idade e freqüentemente acompanhada de bacteremia. A circuncisão de meninos e a amamentação com leite materno parecem ser fatores ligados ao menor risco de infecção.

A partir dos três meses, as meninas passam a ser mais acometidas e as infecções principalmente nos pré-escolares estão associadas a anormalidades congênitas. Nesta faixa etária, o risco para a menina é de cerca de 4,5% e para o menino de 0,5%. Estas infecções são freqüentemente sintomáticas e acredita-se que os danos renais resultantes das ITUs ocorram durante este período da vida.

Nos escolares a prevalência de bacteriúria é de 1,2% nas meninas e de 0,03% nos meninos, sendo em geral assintomática. As pacientes do sexo feminino com bacteriúria assintomática apresentam um risco de até 50% desenvolverem infecção sintomática quando iniciam a atividade sexual ou durante a gravidez. Portanto a presença de bacteriúria na infância define a população de risco em relação ao desenvolvimento de ITU na fase adulta.

Na fase adulta até os 65 anos, a ITU em homens é extremamente baixa (menos de 0,1%), freqüentemente associada com anormalidades anatômicas ou doença da próstata como também à instrumentação das vias urinárias. A prevalência de ITU é um pouco maior (1,5%) em homens jovens atendidos em serviços de doenças sexualmente transmissíveis.

Idosos (acima de 65 anos) apresentam prevalência de ITUs com menores diferenças entre os sexos. Nas infecções comunitárias a prevalência atinge 20% nas mulheres e 10% nos homens, enquanto nas infecções hospitalares esta prevalência é de aproximadamente 30%. Os fatores responsáveis pela incidência elevada de ITU nos idosos incluem:

- doença de base associada
- doenças ou condições que dificultam o esvaziamento normal da bexiga (ex: cistocele e hipertrofia prostática)
- instrumentação das vias urinárias
- manejo da incontinência urinária com cateter vesical
- diminuição da atividade bactericida da secreção prostática
- diminuição do glicogênio vaginal e aumento do pH vaginal

Em mulher pós-menopausa as infecções recorrentes, com três ou mais culturas positivas e sintomáticas em um ano, ou 2 dois episódios de ITU em seis meses, tem como fator predisponente a cistocele, incontinência e aumento do volume de urina residual.

Pacientes internados desenvolvem ITUs mais freqüentemente que pacientes comunitários, tendo em vista as condições gerais dos pacientes hospitalizados e a alta probabilidade de instrumentação do trato urinário, que são os maiores contribuintes para esta diferença.

A ocorrência de bacteriúria em pacientes hospitalizados sem cateterismo é estimada em 1%, e o risco de infecção varia de acordo com o sistema de drenagem utilizado, e a duração do cateterismo. No sistema aberto, atualmente em desuso, cerca de 100% dos pacientes apresentarão bacteriúria em 2 a 4 dias a partir da cateterização, no sistema fechado 5 a 10% dos pacientes apresentarão bacteriúria por cada dia de cateterização. A importância da ITU hospitalar está na sua elevada freqüência e principalmente por ser considerada a principal causa de bacteremia por Gram negativos.

SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

Neonatos e crianças até dois anos de idade com ITU(s) podem ser totalmente assintomáticos ou apresentarem sintomas inespecíficos como: irritabilidade; diminuição da amamentação; menor desenvolvimento pondero-estatural; diarreia e vômitos; febre e apatia, etc. Cerca de 7% dos casos podem estar acompanhados de icterícia e de hepato-esplenomegalia.

Crianças maiores já podem relatar sintomas como: disúria, freqüência e dor abdominal.

No diagnóstico de ITU em crianças menores de dois anos, pode ser feita apenas uma triagem com a urina obtida por coletor, se negativa tem valor diagnóstico de exclusão, mas se positiva, com ou sem leucocitúria, o diagnóstico final depende de coleta por punção supra-púbica ou de urina obtida por

sondagem vesical. Em crianças maiores de dois anos com controle esfinteriano, pode-se utilizar a urina de jato médio.

Adultos com ITU baixa, limitada a uretra e bexiga, geralmente apresentam disúria freqüente, urgência miccional e ocasionalmente dor na região particularmente pielonefrite, são freqüentemente acompanhadas pelos mesmos sintomas das infecções baixas, além supra-púbica. As ITUs altas, particularmente pielonefrite, são freqüentemente acompanhadas pelos mesmos sintomas das infecções baixas, além de dor nos flancos e febre. Bacteremia quando presente poderá confirmar um diagnóstico de pielonefrite ou prostatite.

AGENTES ETIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

A flora normal da região periuretral é definida de acordo com a faixa etária e condições do paciente e, raramente, causam ITUs apresentando em geral contagem de colônias menor que 1000 UFC/ml, sendo constituída de: *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp. (difteróides), *Staphylococcus* spp. (exceto *Staphylococcus aureus* e *S. saprophyticus*), *Lactobacillus* spp.

Manifestações clínicas e microrganismos freqüentemente associados com os vários tipos de ITUs.

	Tipo de Infecção	Manifestação clínica	Microrganismo isolado	Diagnóstico e contagem de colônias (UFC/ml)
Trato Urinário Alto	Pielonefrite	Aguda: febre, náusea, calafrios, vômito, dor no flanco	Enterobactérias: <i>E. coli</i> e outros grams negativos, <i>Enterococcus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	≥ 10 ⁵
		Crônica: assintomática		
Trato Urinário Baixo	Cistite	Disúria e freqüência	<i>Escherischia coli</i> e outros grams negativos, <i>S. saprophyticus</i> , <i>Enterococcus</i>	≥ 10 ⁵
	Uretrite	Disúria, freqüência, corrimento uretral	<i>Chlamydia Trachomatis</i> (a) <i>Mycoplasma hominis</i> (b) <i>Ureaplasma urealyticum</i> (c) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (d) <i>Trichomonas vaginalis</i> (e) <i>Candida albicans</i> e spp. (f)	Urocultura negativa a) Diagnóstico por IFD b) e c) secreção uretral semeada em meios de cultura específicos. Alguns kits permitem contagem de colônias - ≥ 10 ⁴ ucf/ml d) cresce em ACH e TM e) exame direto de jato inicial de urina centrifugada f) podem crescer em ágar sangue ou CLED
	Prostatite	Aguda: febre, calafrios, dor lombar Crônica: assintomática ou semelhante aos sintomas da aguda	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp. e outras enterobactérias <u>Menos frequente:</u> <i>Enterococcus</i> spp. <i>P. aeruginosa</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i> * <u>Questionável:</u> micoplasmas	Urocultura ou cultura da secreção prostática ≥ 10 ³ ucf/ml *diagnóstico por IFD
Infecção Hospitalar do Trato Urinário	Cistite Pielonefrite	Disúria e freqüência urinária na presença de SVD pode ser assintomático	<i>Escherischia coli</i> e outras enterobactérias <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp., Enterococos <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>Candida</i> spp. <i>Staphylococcus coag.</i> Neg	≥ 10 ⁵

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A maioria das ITUs é diagnosticada através de dados clínicos e laboratoriais como piúria e ou bacteriúria e também pela urocultura com contagem de colônias.

Pesquisa da Piúria - reflete a possibilidade de resposta inflamatória do trato urinário. A causa mais comum é a infecção bacteriana que poderá ser confirmada pela urocultura; porém a piúria poderá ser evidenciada nas situações clínicas apresentadas abaixo, cuja urocultura resulta negativa.

a) Não infecciosa:

- doença túbulo-intersticial (nefropatia por analgésicos e beta-lactâmicos)
- cálculos e corpos estranhos
- terapia com ciclofosfamida
- rejeição de transplante renal
- trauma genitourinário
- neoplasias
- glomerulonefrite

b) Infecciosa (microrganismos de difícil cultivo):

- Tuberculose e infecções causadas por micobactérias atípicas
- *Haemophilus influenzae*
- *Chlamydia* spp. e *Ureaplasma urealyticum*
- Gonococos
- Anaeróbios
- Fungos
- vírus (herpes, adenovírus, varicela-zoster)
- Leptospiras

c) Outras causas infecciosas:

- durante ou até uma semana após o tratamento adequado da ITU
- Infecção "mascarada" pela antibioticoterapia
- infecções adjacentes ao trato urinário (apendicite, diverticulite e prostatite)

A pesquisa de piúria poderá ser realizada por diferentes métodos manuais e automatizados:

Métodos	Princípios	Limites de Detecção
Microscópico: - Gram	Reconhecimento das bactérias por características morfo-tintoriais. Gram de uma gota de urina não ccentrifugada	≥ 1 bactéria em campo de imersão $\geq 10^5$ UFC/ml
Pesquisa de Leucócitos (urina não centrifugada): - lâmina e lamínula	Pequeno aumento 10x Aumento 40x Grande aumento 100x	30 leucócitos/campo 5 leucócitos/campo 1-2 leucócitos/campo
- câmara de contagem	Contagem na câmara de hemocitômetro	≥ 10 plócitos/ml (valor clínico)
- excreção urinária de leucócitos	Determinação da excreção	≥ 400.000 leucócitos/hora
- sedimento urinário	Determinação no sedimento	≥ 10 plócitos/ml (valor clínico)
Testes Químicos: - fitas nitrato redutase – teste de Griess	Bactérias gram negativas reduzem Nitrato a Nitrito	$\geq 10^4$ UFC/ml falso neg em cocos gram + e Pseudomonas
- esterase leucocitária	Detecta a presença dessa enzima nos leucócitos	Equivale a 5 leucócitos/campo 40x

Os testes utilizando fitas reagentes têm bom valor preditivo para afastar infecção urinária, no entanto apresentam baixo desempenho para sugerir ITU. Altas doses de vitamina C podem dar falso teste negativo para nitrito na fita, e a presença de *Trichomonas* pode dar teste positivo para esterase leucocitária.

Valores de Sensibilidade, especificidade e valor preditivo (VP) dos testes nitrito e esterase leucocitária, para prever 10⁵ UFC/ml

TESTE	Sensibilidade %	Especificidade %	VP (%) do teste positivo	VP (%) do teste negativo
Nitrito	69	90	57	94
Esterase leucocitária	71	85	47	94

Bacterioscopia de urina:

- Com a urina não centrifugada, e apenas homogeneizada, pegar uma alça com 10 µl de urina e depositar sobre uma lâmina de vidro;
- Deixar secar, fixar na chama e corar pelo gram.
- Com objetiva de imersão (1000x) fazer contagem.
- Se encontrar 1 ou mais bactérias por campo, sugere $\geq 10^5$ UFC.
- A presença de células epiteliais e vários tipos morfológicos de bactérias sugere contaminação.

Bacteriúria - a pesquisa de bacteriúria poderá ser realizada através da bacterioscopia da urina, testes bioquímicos e cultura de urina.

QUANTIFICAÇÃO DA BACTERIÚRIA - CONTAGEM DE COLÔNIAS

A identidade da bactéria infectante isolada na cultura de urina é um dos fatores indicativos de infecção, porém não podemos esquecer que existem microrganismos que colonizam freqüentemente a uretra distal de pacientes, e que raramente causam ITUs. Cerca de 10 a 20% das pacientes apresentam colonização da mucosa vaginal e da região periuretral por enterobactérias por esta razão, além da identificação de bactérias uropatógenas, a avaliação do número de unidades formadoras de colônias UFC por ml tornou-se um critério importante na interpretação da urocultura, já que os microrganismos colonizantes geralmente apresentam-se em contagens baixas.

O critério de diagnóstico tradicional de Kass (1956), determina a contagem $\geq 10^5$ UFC/ml como limite indicativo de infecção urinária. Contudo, no caso de pacientes do sexo feminino apresentando infecção urinária sintomática não complicada, este limite corresponde a uma alta especificidade e uma baixa sensibilidade. De fato, cerca de terço das mulheres com síndrome clínica de disúria, freqüência, urgência e piúria e que melhoram com o uso de antimicrobianos, apresentam contagens entre 10² a 10⁴ UFC/ml, segundo critério de Stamm (1982). Portanto, atualmente torna-se necessário que os laboratórios utilizem os critérios propostos por Stamm e comecem a detectar microrganismos a partir de 10² UFC/ml, principalmente nesta população de mulheres.

Comparação de Contagem de Colônias para ITU Baixa por coliformes.

Pesquisador	Urina	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo	
				Positivo	Negativo
Stamm (1982)	$\geq 10^2$ coliformes/ml	0.95	0.85	0.88	0.94
Kass (1956)	$\geq 10^5$ coliformes/ml	0.51	0.99	0.98	0.65

O resultado da urocultura deverá ser avaliado juntamente com os outros dados laboratoriais (pesquisa de bacteriúria e/ou piúria) e clínicos (presença ou ausência de sintomas, fatores predisponentes, população de risco, etc.). Considerando-se que as amostras de urina submetidas a cultura são provenientes de pacientes com sintomas de ITU e de pacientes assintomáticos com alto risco de Infecção.

Apresentamos na tabela seguinte os diversos métodos utilizados para a quantificação da urina e posterior identificação e antibiograma.

Parâmetros para interpretação das uroculturas

Parâmetro	Método e Interpretação	Comentário
Semi-Quantitativa	Lamino cultivo e Dispstick ou Dip-slide	Técnica semi-quantitativa
Quantitativa	Pour-plate 1 microrganismo = 1000 UFC/ml	Método clássico padronizado raramente utilizado, pois é muito trabalhoso.
	Alça calibrada = 0,01 ml 1 colônia = 100 UFC/ml Alça calibrada = 0,001 ml 1 colônia = 1000 UFC/ml	Mais utilizada e de fácil execução

Lamino-cultivo

O lamino-cultivo consiste de um recipiente plástico cilíndrico, onde pode também ser coletado a urina, com uma tampa ligada a um suporte plástico com duas faces contendo meios de cultura como CLED e Mac Conkey ou outras combinações. Esta técnica tem sido muito utilizada tanto por laboratórios com pequena rotina, como aqueles de grande movimento pelos seguintes motivos:

- Facilita a semeadura, pois não necessita de alça calibrada ou outra medida de volume.
- Facilita o transporte da urina semeada utilizando o próprio recipiente do lamino-cultivo.
- Fácil conservação do produto em temperatura ambiente por cerca de seis meses.
- Identificação sumária dos principais patógenos encontrados, dependendo do produto adquirido.

Estes meios permitem identificar através de algumas provas bioquímicas rápidas alguns dos principais gêneros de bactérias ou pelo menos sugerir ou afastar a presença de *E. coli*. A coleta deve seguir os padrões normais de assepsia e orientação, e a semeadura é feita sobre o próprio lamino-cultivo, de forma que as faces do produto sejam colocadas uniformemente em contato com a urina.

- despejando-se a urina durante a coleta ou após coletada em frasco estéril
- semeada com um swab embebido na urina homogeneizada.

As principais desvantagens do método são:

- o método é semi-quantitativo
- superfície menor de leitura e observação de crescimento

Método Pour plate

Preparar previamente a diluição da urina para obtenção de um fator a ser utilizado na interpretação.

- 9,9 ml de salina + 0,1 ml da urina (10⁻²)
- 9,9 ml de salina + 0,1 ml da 1ª diluição (10⁻⁴)
- Adicionar 1 ml da última diluição em placa de Petri (150 mm)
- Acrescentar o Ágar Müller Hinton (fundido), homogeneizando e incubando à 35-37°C em aerobiose durante 24 h.
- A leitura é feita multiplicando o número de colônias obtido, pelo fator de diluição.

Semeadura com Alça Calibrada

Alguns trabalhos recomendam a semeadura das urinas somente com a alça calibrada 0,01µl (10 µL), procurando detectar-se contagem de colônias a partir de 100 UFC/ml, outros trabalhos porém recomendam a semeadura de acordo com a origem da amostra como o proposto abaixo.

Recomendação da Inoculação por Alça Calibrada segundo a origem da amostra clínica de urina

Amostra	0,001 ml ou 1 µl ¹	0,010 ml ou 10 µl ²
Jato médio feminino		X

Jato médio masculino	X	
Cateter	X	
Punção Supra-púbica		X
Cistoscopia		X

¹- uma colônia com alça de 1 µL = 1000 UFC/ml

²- uma colônia com alça de 10 µL = 100 UFC/ml

Utilizado para amostras onde a contagem de colônias baixa tem significado clínico

Esse método consiste em utilizar a urina não diluída, e fazer a semeadura utilizando-se uma alça de platina ou de plástico (disponível comercialmente), de diâmetro calibrado capaz de carrear uma quantidade fixa de urina (0,001 ou 0,01ml), padronizando desse modo o fator de diluição.

Técnica: Em sua execução a alça bacteriológica é introduzida em uma amostra de urina bem homogeneizada, fazendo-se movimentos para baixo e para cima no sentido vertical. A alça carregada é então utilizada para inocular cada meio de cultura, fazendo-se, inicialmente, uma linha reta no centro da placa e completando-se o espalhamento com uma série de passagens em um ângulo de 90°, através da linha original. Importante item de controle de qualidade é utilizar alças calibradas periodicamente aferidas ou, quando possível, alças descartáveis.

Meios de cultura: As placas com meio seletivo (Mac Conkey ou EMB) e outro meio não seletivo (Ágar Sangue de Carneiro a 5%) deverão ser incubadas 24 horas à 35-37°C, devendo este período ser prolongado quando as condições clínicas justificarem ou quando houver suspeita de infecção por Gram positivos (*Enterococos* e *Streptococcus agalactiae* ou leveduras). Atualmente utiliza-se muito o meio CLED, que permite crescimento das enterobactérias, impedindo o espalhamento dos *Proteus*, a maioria dos gram positivos e leveduras. É prudente a leitura em 48-72 horas quando a contagem de leucócitos ou a bacterioscopia sugerirem infecção urinária e não for verificado crescimento bacteriano em 24 horas.

Nos casos de suspeita clínica de ITU por anaeróbios, o material clínico adequado para cultura é a urina obtida por punção supra-púbica e semeada de acordo com as orientações deste manual para cultura de anaeróbios. Quando houver suspeita de ITU fúngica, recomenda-se semear de acordo com as orientações deste manual referentes às infecções fúngicas.

Outros dados laboratoriais que podem contribuir para o diagnóstico:

- Hematúria: quando detectada isoladamente sugere tuberculose renal, litíase renal, doença policística renal, cistite viral e trauma após cateterização.
- Proteinúria: resposta fisiológica à exercícios físicos prolongados ou postura ereta (proteinúria ortotástica)
- Hemocultura positiva: indica a presença de microrganismo na corrente sanguínea proveniente de um sítio conhecido (pulmão, osso, dente etc.) ou de um sítio desconhecido. Em pacientes com pielonefrite aguda a hemocultura é positiva em 25%. A bacteremia é também bastante freqüente nos neonatos com infecção do trato urinário.

Prostatite - Cerca de 50% dos homens em algum momento da vida irão apresentar sintomas sugestivos de prostatite, embora apenas 5-10% serão caracterizados como casos agudos ou crônicos. Os demais apresentarão quadros inflamatórios não infecciosos. O diagnóstico de prostatite bacteriana aguda é, muitas vezes, confundido nos homens abaixo de 50 anos com infecção urinária. A prostatite pode ser detectada com base em uroculturas positivas, ou cultura de secreção prostática com presença de neutrófilos na secreção. Os sintomas, geralmente, são intensos na infecção aguda, enquanto que na prostatite crônica eles são insidiosos, manifestando-se por infecções urinárias repetidas, ou sintomas genitourinários irritativos ou obstrutivos.

Na fase aguda é contra-indicada a coleta de secreção prostática pela dor, embora o toque retal cuidadoso já possa sugerir este diagnóstico, documentado por urocultura. Os principais agentes são a *E. coli*, *Proteus* spp., e outras enterobactérias, sendo menos freqüente o enterococo. É controverso o papel de estafilococos, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Trichomonas* e vírus.

2. INFECÇÕES DE OSSOS E ARTICULAÇÕES

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo normal apresenta resistência natural às infecções, que, no entanto, podem ocorrer quando este tecido é traumatizado, sua nutrição comprometida, pela presença de inóculo microbiano significativo e/ou presença de corpo estranho. Um processo infeccioso agudo do tecido ósseo caracteriza a osteomielite aguda, que na ausência de tratamento ou tratada de forma inadequada evolui a partir de 10 dias para osteomielite crônica, com necrose tecidual, processo inflamatório, presença de pus, seqüestro ósseo, podendo comprometer partes moles e podendo drenar através de fístula, com evolução lenta por semanas meses ou anos.

O inóculo bacteriano comumente é introduzido pelo trauma, contigüidade (úlceras), via hematogênica (bacteremia ou êmbolo), introdução de corpo estranho (próteses) e quebra de barreiras (procedimentos cirúrgicos), etc.

A correta identificação do agente etiológico e seu teste de sensibilidade aos antimicrobianos é de fundamental importância para as perspectivas de sucesso terapêutico. Não se recomenda fazer avaliação microbiológica com base em material obtido com swab do orifício de drenagem de fístula, de ferida, úlcera, etc.

A amostra clínica para o isolamento do agente deve ser obtida por procedimento cirúrgico ou por punção biópsia aspirativa com técnica asséptica e material suficiente para:

- Bacterioscopia pelo Gram, quando indicado coloração de Ziehl Neelsen
- Exame histopatológico (recomendável)
- Cultura para bactérias aeróbias e facultativas
- Caso indicado cultura para fungos, micobactérias e anaeróbios.

MICROORGANISMOS MAIS FREQUENTES

OSTEOMIELITE

Hematogênica – *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *S. agalactiae* (recém-nascido), *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp. (cateter).

Associação com quadros clínicos

Pós-trauma	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., Enterobactérias, <i>Staphylococcus</i> spp., bactérias anaeróbias.
Pós-operatório	Fixação de fratura: Coliformes, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> Esternotomia: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> Colocação de próteses: <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , Enterobactérias e <i>Pseudomonas</i> spp..
Pós-mordida de animal	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Eikenella corrodens</i> .
Insuficiência vascular	Enterobactérias, anaeróbios.
Anemia falciforme	<i>Salmonella</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Pé diabético e úlcera de decúbito	<i>Streptococcus</i> spp., Anaeróbios, Gram negativos.
Infecção por HIV	<i>Bartonella henselae</i>

Imunossuprimidos	<i>Aspergillus</i> spp., Complexo <i>M. avium</i> , <i>Candida</i> spp.
Usuários de droga endovenosa e pacientes que fazem hemodiálise crônica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Locais onde as doenças tem alta prevalência	<i>M. tuberculosis</i> , <i>Brucella</i> spp.,
Infecção hospitalar	Enterobactérias e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

ARTRITE SÉPTICA

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus* spp.
- *Enterococcus* spp.
- Enterobactérias

Crônica e monoarticular	<i>Brucella</i> spp., <i>Nocardia</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., Fungo
Por faixa etária	<p><u>Até 3 meses</u>: <i>S. aureus</i>, Enterobacterias, <i>S. agalactiae</i> (grupo B) e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.</p> <p><u>3 meses a 14 anos</u>: <i>S. aureus</i> (27%), <i>S. pyogenes</i> (14%), <i>S. pneumoniae</i> (14%), <i>Haemophilus influenzae</i> (3%), bacilos Gram negativos (6%), <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>N. meningitidis</i> (14%) e desconhecida (36%).</p> <p><u>Adultos</u>: <i>N. gonorrhoeae</i>, <i>S. aureus</i>, <i>Streptococcus</i> spp., raramente bacilos gram negativos.</p>

PRÓTESES ARTICULARES

- *S. aureus*
- *Staphylococcus* spp (coagulase negativos)

Artrite reacional ou Síndrome de Reiter

Pode ocorrer após semanas infecção por: *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella*, *Salmonella*.

Poliartrite assimétrica que pode acompanhar de uretrite, conjuntivite, uveíte e rash cutâneo. É importante lembrar como diagnóstico diferencial de artrite migratória causada pela febre reumática, pós-infecção, por *Streptococcus pyogenes*.

COLETA E TRANSPORTE DO MATERIAL

Estas amostras deverão ser colhidas através de procedimentos invasivos: punções ou durante o ato cirúrgico. Observando-se os cuidados de assepsia para que a amostra coletada não seja contaminada.

A secreção ou líquidos serão aspirados com o auxílio de agulha e seringa estéreis e colocados em frasco estéril ou em meio de transporte para anaeróbios facultativos e estritos (caldo de tioglicolato) - eventualmente mantidos na própria seringa, nunca usando a agulha para obstruir a seringa, pelo risco de acidentes. Eentão encaminhados rapidamente ao laboratório de microbiologia.

PROCESSAMENTO DE AMOSTRA

No laboratório de microbiologia, estas amostras serão processadas nas seguintes etapas:

Avaliação da qualidade do material encaminhado:

Identificação adequada, frasco/meio de transporte correto, volume da amostra suficiente para os testes requeridos, data/horário da coleta.

Coloração de Gram:

Serão observados forma, coloração e agrupamento dos microrganismos, além da presença de células (leucócitos íntegros ou degenerados, inclusões bacterianas, etc). Se houver suspeita de microrganismos álcool-ácido resistentes, preparar também lâminas para coloração de Ziehl Neelsen, e na suspeita de fungos, preparação de azul de lactofenol ou de algodão.

Semeadura em meios adequados:

Meios de cultura para bactérias aeróbias	<u>Ágar sangue</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Incubar a 35°C durante 18 a 24 h▪ Verificar crescimento bacteriano:<ul style="list-style-type: none">– se negativo, incubar mais 24 h– se positivo, identificar o microrganismo <u>Ágar chocolate suplementado</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Incubar a 35°C em jarra com 5% CO₂ durante 18 a 24 h▪ Verificar o crescimento bacteriano:<ul style="list-style-type: none">– se negativo, reincubar– se positivo, proceder à identificação do microrganismo
Meios de cultura para bactérias anaeróbias	<u>Brucella ágar acrescido de vitamina K (menadiona) e hemina</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Incubar a 35°C em jarra de anaerobiose durante 48 h▪ Verificar crescimento<ul style="list-style-type: none">– se negativo, repicar a amostra do tioglicolato a cada 48 h até completar 7 dias– se positivo, proceder à identificação da bactéria
Culturas especiais	<ul style="list-style-type: none">▪ Se houver suspeita clínica de micobactérias, semear em meios especiais (Lowenstein Jensen ou Middlebrook); aguardar 60 dias para concluir a cultura como negativa.▪ Se houver suspeita clínica de fungos, semear em Ágar Sabouraud-glicose; incubar à temperatura ambiente durante 4 semanas.▪ Em caso de suspeita clínica, outras culturas especiais podem ser disponibilizadas com meios específicos: culturas para Legionela, Micoplasma, Clamídia e outros agentes fastidiosos.▪ As culturas para vírus demandam estrutura laboratorial especializada em cultura celular. Quando realizadas devem ser finalizadas com a tipagem monoclonal de cada vírus suspeito.

3. INFECÇÕES DA PELE E TECIDO SUBCUTÂNEO

INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais acessível do corpo, um dos mais facilmente traumatizável e sujeito à infecção, sendo composta de duas camadas. Uma superficial denominada epiderme e a outra mais profunda denominada derme. Os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas abrem-se para a superfície cutânea. Abaixo da derme está a camada subcutânea adiposa, sob a qual localiza-se a fina membrana fascial que recobre os músculos, ligamentos e outros tecidos conjuntivos. O plano fascial cria espaço em várias partes do corpo, incluindo a cabeça, o pescoço, dedos, mãos e pés. A fascia é uma barreira que determina a extensão por onde a infecção pode se disseminar, mas pode também criar desafios terapêuticos devido à sua impermeabilidade, tendo de ser tratada cirurgicamente.

As infecções cutâneas envolvem uma grande diversidade de agentes etiológicos e mecanismos patogênicos múltiplos. Estas infecções são classificadas em primárias ou secundárias, (dependendo da existência ou não de uma porta de entrada anterior à infecção), agudas ou crônicas (de acordo com a duração da infecção), podendo ainda ser mono ou polimicrobianas. As infecções que têm o foco primário em estruturas profundas podem manifestar-se como erupções cutâneas. As infecções primárias ocorrem em pacientes sem porta de entrada evidente (Ex: erisipelas). As infecções secundárias ocorrem, como complicações de lesões de pele (abrasões), traumas cirúrgicos ou feridas penetrantes. Tais infecções podem ser tanto monomicrobianas, tais como feridas infectadas por estafilococos, ou polimicrobianas, como em algumas condições gangrenosas causadas por estreptococos microaerófilos e anaeróbios. As infecções secundárias podem ser localizadas ou disseminadas, dependendo da extensão das doenças de base, ou precipitadas por algum trauma. Como exemplo de infecções agudas ou crônicas podemos citar um furúnculo estafilocócico que acaba em poucos dias, enquanto que algumas infecções fúngicas crônicas podem durar meses ou anos.

LESÕES ERITEMATOSAS E SUPERFICIAIS: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

IMPETIGO

É uma infecção cutânea intra-epidérmica superficial que produz lesões eritematosas, podendo ser acompanhados de lesões pustulares ou bolhosas. O impetigo não bolhoso é normalmente causado por *Streptococcus pyogenes*, beta hemolítico do grupo A, enquanto que *Staphylococcus aureus* tem sido associado com a doença na forma bolhosa.

As lesões do impetigo não-bolhoso iniciam-se como pápulas eritematosas pequenas, que então formam vesículas (1 a 2 cm de diâmetro). Dentro de poucos dias as vesículas formam pús e se rompem. O exsudato purulento seca formando crostas finas características de coloração âmbar ou castanha, circundadas por um halo eritematoso. O exame microbiológico do material da lesão produz cultura pura de estreptococos do grupo A ou cultura mista de *S. pyogenes* e *S. aureus*, embora o estafilococo seja geralmente considerado mais uma invasão secundária do que patógeno primário.

O impetigo bolhoso causado por *S. aureus* é menos comum do que o causado por *S. pyogenes* e ocorre geralmente em crianças recém-nascidas. As lesões começam como vesículas e depois formam grupos característicos de bolhas superficiais flácidas (0,5 a 3,0 cm de diâmetro) com o mínimo ou nenhuma eritema circundante. As bolhas apresentam parede fina e rompem-se facilmente, revelando camada cutânea básica semelhante a queimadura de segundo grau, caracterizada como síndrome da pele escaldada. O exsudato pode ser seroso ou purulento e forma uma crosta fina marrom em desidratação.

ERISIPELA E CELULITE

A erisipela é uma infecção cutânea geralmente causada por estreptococo do grupo A, tendo sido descritos raros casos devidos a estreptococos C e G. A infecção envolve principalmente a derme e as partes mais superficiais do tecido subcutâneo com envolvimento proeminente dos linfáticos superficiais. A erisipela apresenta uma área cutânea endurecida, edematosa, avermelhada e dolorida, eventualmente com pequenas vesículas ou bolhas na superfície cutânea. O quadro clínico típico é caracterizado pelo aparecimento de alterações cutâneas com bordas elevadas e nitidamente

demarcadas com pele adjacente normal ou não envolvida. O ataque agudo de febre e calafrio é notório com invariável presença de linfadenopatia.

Ao contrário da erisipela, a margem da área de celulite é pouco definida sem elevação central. O estreptococo do grupo A e o *S. aureus* são considerados os agentes etiológicos mais comuns. Algumas espécies de *Vibrio* e *Aeromonas* podem causar celulite após introdução do microrganismo através da ferida ou laceração ocorrida durante a natação em água doce ou água do mar. A celulite causada por *H. influenzae* é relativamente rara, mas a forma distinta desta infecção é que ela está geralmente associada com bacteremia e afeta tipicamente crianças de seis meses a 3 anos de idade.

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de impetigo é feito geralmente através das características clínicas das lesões. A confirmação bacteriológica geralmente não é necessária, mas pode-se cultivar em Ágar sangue o material obtido da base da lesão após lavagem com água e sabão, assepsia local com álcool a 70% e remoção da crosta. Evidência sorológica de infecção recente por *Streptococcus* do grupo A poderá ser utilizado no diagnóstico retrospectivo. A detecção do anticorpo anti-Dnase B é um indicador mais sensível de infecção cutânea pelo estreptococo do que o título de ASLO (anti-estreptolisina O), provavelmente devido à inibição de estreptolisina pelos lipídios da pele presentes na lesão.

FOLICULITE

É uma infecção e inflamação dos folículos pilosos geralmente iniciada pelo bloqueio do folículo ou por pequenos traumas. A infecção é caracterizada por pápulas ou pústulas côncavas, perfuradas por pêlo circundado por um halo eritematoso. A infecção é em geral causada pelo *S. aureus*. Embora a etiologia da foliculite possa ser confirmada por cultura do pús ou exsudato da lesão, esta prática geralmente não é necessária. Outras causas menos comuns de foliculite incluem membros da família Enterobacteriaceae (especialmente *Proteus sp.*). Esta pode ocorrer em pacientes com *Acne vulgaris* que recebem antibióticos orais por um período prolongado de tempo. Recentemente foram verificados surtos de foliculite através do uso de banheiras de hidromassagem e piscinas contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa*. A erupção cutânea consiste de coceira, pápulas eritematosas ou pápulo-pustulosas.

A erupção não é única em aparência, mas tem distribuição característica envolvendo principalmente as nádegas, quadris, coxas e axilas. Estas são áreas onde se localizam as glândulas sudoríparas apócrinas as quais tendem a ser ocluídas quando se usam roupas apertadas. Além da erupção, muitos pacientes manifestam febre baixa, cefaléia, indisposição, dor de ouvido (devido à otite externa concomitante) e dor no peito (devido à mastite). A doença pode levar várias semanas, mas é geralmente autolimitada, de cura espontânea, não necessitando de terapia específica.

Diagnóstico Laboratorial

Na foliculite estafilocócica, geralmente a bactéria não é vista no Gram e nem na cultura. Já na foliculite por *Pseudomonas*, o microrganismo pode ser recuperado de pústulas maiores, embora na maioria dos casos a cultura também se apresenta negativa.

FURUNCULOSE E CARBÚNCULO

O furúnculo é um abscesso que se inicia no folículo piloso como um nódulo avermelhado, tornando-se doloroso e amolecido. O carbúnculo é mais profundo e extenso, apresentando-se freqüentemente como abscessos subcutâneos múltiplos envolvendo vários folículos e glândulas sebáceas, drenados através dos folículos pilosos.

O carbúnculo pode estar associado com febre, mal-estar e pode se complicar pela celulite ou bacteremia. Tanto o furúnculo como o carbúnculo ocorrem em tecido cutâneo pela fricção e abafamento dos sítios onde se encontram os folículos (virilha, axila, pescoço e face). O *S. aureus* é o patógeno mais freqüente. Tratamento com compressas quentes é geralmente adequado para pequenos furúnculos localizados. Antibióticos anti-estafilocócicos tais como oxacilina e clindamicina podem ser necessários na presença de febre ou na existência de celulite circundante, especialmente se o furúnculo ou carbúnculo estiveram localizados na face.

PARONÍQUIA

É uma infecção superficial na prega da unha que pode ser aguda ou crônica. As infecções agudas são devidas a *Staphylococcus aureus*, que poderá ser cultivado de drenagem purulenta.

Tratamento com compressas quentes são geralmente adequadas, embora a incisão cirúrgica e drenagem sejam necessárias. A paroníquia crônica é geralmente associada com imersões freqüentes das mãos em água de sabão, sendo o agente mais comum a *Candida sp.*

Diagnóstico Laboratorial

Poderá ser confirmado pela cultura do aspirado ou drenagem do pús em aerobiose no Ágar Sangue.

Diagnóstico de lesões eritematosas superficiais

Doenças e Síndromes	Agente etiológico mais freqüente	Diagnóstico Laboratorial
Impetigo	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue ou Ágar Chocolate
Erisipela	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A), eventualmente outros sorogrupos (G,C ou B)	Gram, Cultura em Ágar Sangue, Ágar chocolate, Caldo trypticase soja
Celulite	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> Menos freqüentes: Enterobactérias, <i>Pasteurella spp.</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Erysipelotrix spp.</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue, Ágar Chocolate, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato, Caldo trypticase soja.
Foliculite, Furúnculos e Carbúnculo	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram, Cultura em Ágar Sangue
Paroníquia	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida spp.</i>	Gram, Cultura em Ágar em Sangue
Micoses superficiais	<i>Candida spp.</i> , <i>Epidermophyton spp.</i> , <i>Microsporum spp.</i>	KOH 10%, Ágar Sabouraud, Dextrose + cloranfenicol e cicloheximida

ULCERAÇÕES E NÓDULOS: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

Nas ulcerações cutâneas geralmente há uma perda parcial do tecido dérmico ou epidérmico. Nódulos são focos inflamatórios onde a maior parte da camada superficial cutânea está intacta. Uma variedade de bactérias e fungos causa lesões nodulares ou ulceradas do tecido cutâneo, ou ambas, após inoculação direta. Exemplos importantes incluem: *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Nocardia spp.*, *Mycobacterium marinum* e *Sporotrix schenckii*.

Alternativamente, as infecções cutâneas podem ocorrer após a disseminação hematogênica de microrganismos que eclodem na pele provenientes de outros focos de infecção. Por exemplo, *P. brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans* podem apresentar a infecção pulmonar primária com disseminação hematogênica para sítios extrapulmonares, tais como tecidos moles e cutâneos. A microscopia e a cultura são os principais métodos para diagnóstico laboratorial. Contudo, existem alguns testes sorológicos disponíveis para certos microrganismos, incluindo alguns fungos.

Diagnóstico de ulcerações e nódulos

Doenças e Síndromes	Agente Etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Lesões esporotricóides	<i>Sporotrix schenckii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i>	Gram, Ziehl, PAS, Gomori Methenamina, auramina, cultura de biópsia para <i>Mycobacterium</i> , Ágar Sangue (selado com parafilme durante 4 semanas), Sabouraud dextrose com cloranfenicol e cicloheximida.

Blastomicose, Criptococose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	Cultura em Ágar Sangue, Sabouraud, dextrose + cloranfenicol + ciclohexemida, Tinta da china e/ou calcofluor para <i>C. neoformans</i> .
Difteria cutânea	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Coloração de Gram/ Albert Layburn, Meios de Loeffler e Ágar cistina-telurito.
Antraz	<i>Bacillus anthracis</i>	Cultura em Ágar Sangue e Ágar Sangue telurito

FÍSTULAS E QUEIMADOS: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

FÍSTULAS

Os principais agentes etiológicos e os recursos para diagnóstico laboratorial encontram-se na Tabela abaixo.

Fístula é uma comunicação entre o tecido profundo infectado ou abscesso através do tecido subcutâneo abrindo-se sobre a superfície cutânea. Isto ocorre em infecções profundas como em osteomielites, piomiosites, linfadenites ou abscessos intra-abdominais. As infecções de próteses como as de quadril e fêmur, cirurgias cada vez mais frequentes, são causas comuns de fístulas de longa duração, cujo tratamento não responde ao uso isolado de antimicrobianos exigindo quase sempre a retirada da prótese. Em muitos casos a infecção é polimicrobiana e os germes que colonizam as porções cutâneas da fístula podem ser diferentes dos encontrados no tecido profundo. Por esta razão as culturas feitas a partir do material que exsuda para a superfície cutânea da fístula podem ser enganosas.

Vários microrganismos de infecções do tecido mole são caracterizados através do trato fistulizado. O *Staphylococcus aureus* produz abscessos profundos (carbúnculo) e secreta pús espesso. A linfadenite cervical causada por micobactéria, especialmente a tuberculose cervical, pode produzir drenagem crônica da fístula denominada escrófulo. A actinomicose classicamente definida como queixo granuloso é uma infecção cérvico-facial extremamente dolorida e edemaciada ao redor do ângulo do queixo que drena secreção aquosa contendo os denominados grãos de enxofre (devido a cor amarelada). Estes grânulos amarelados são constituídos de massas bacterianas, medindo geralmente 2 mm de diâmetro. Quando não tratada, a actinomicose progride para uma fistulização crônica.

A fonte de tal microrganismo é a cavidade oral do próprio paciente e a má higiene bucal provavelmente constitui o fator desencadeante. A maduromicose plantar ocorre quando os microrganismos do solo como *Nocardia sp* e vários fungos (ex: *Petriellidium boydii*, *Madurella mycetomatis* e *Phialophora verrucosa*), são inoculados em tecidos moles do pé e produzem múltiplos abscessos com fístulas e às vezes osteomielites.

Diagnóstico Laboratorial

A cultura é extremamente prejudicada pela dificuldade na obtenção das amostras clínicas provenientes do trato fistulizado. Existe uma baixa correlação entre os resultados de cultura do material superficial e aqueles obtidos de tecidos profundos infectados. Se for realizada uma exploração cirúrgica, pode-se então fazer cultura do material obtido das porções mais profundas da fístula. É possível ainda obter material para cultura através de punção ou cateterização da fístula com cuidados de assepsia. Se aparecerem sintomas generalizados como febre e calafrios é indicada a realização da hemocultura, que poderá revelar microrganismos mais significativos.

O procedimento para cultura pode ser o mesmo feito com feridas cirúrgicas e deve ser programado para recuperar tanto bactérias aeróbias como anaeróbias.

Diagnóstico de Fístulas

Doenças e Síndromes	Agente Etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Actinomicose	<i>Actinomyces spp.</i>	Gram, cultura em anaerobiose à 37°C, em Ágar Sangue e em caldo por 1-2 semanas.
Maduromicos e	<i>Madurella mycetomatis</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> ,	KOH 10%, cultura em Ágar Sabouraud com e

Maduromicos podal	<i>Petrellidium boydii</i>	sem cloranfenicol + Cicloheximida.
Tuberculose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ziehl-Neelsen, auramina, cultura em meio de Lowenstein-Jensen, PCR
Infecções mistas ou foco crônico	<i>Staphylococcus aureus</i> , Enterobactérias, <i>Pseudomonas</i> spp.	Gram, cultura do aspirado ou do tecido profundo em ágar-sangue e ágar Mac Conkey

QUEIMADOS

Historicamente, o estreptococo hemolítico e o estafilococo foram os microrganismos mais comumente encontrados em infecções de queimados. Com o advento dos antimicrobianos, tais infecções foram substituídas por *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistentes (ORSA), bacilos Gram negativos, notadamente *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras como a *Candida albicans* ou fungos filamentosos como *Fusarium sp.*

Diagnóstico Laboratorial

A superfície queimada contém tecido morto e fluido rico em proteínas. Microrganismos da flora do próprio paciente ou do meio ambiente colonizam esta superfície. O crescimento dos germes sobre tal superfície continua até que esteja presente uma densa carga microbiana. Quando a concentração bacteriana for grande o suficiente, ocorre infiltração dos tecidos mais profundos provocando infecção generalizada com bacteremia. Os estudos sugerem que a ocorrência de invasão, seguida de complicações está associada à contagem bacteriana de 10^5 UFC/grama de tecido. Isto leva ao desenvolvimento de métodos quantitativos, tanto em esfregaços como em culturas como também para as biópsias cirurgicamente removidas das queimaduras.

Foi demonstrado que culturas somente de tecidos superficiais são inadequados e freqüentemente enganosos. Conseqüentemente, a cultura de tecido profundo é empregada em muitos laboratórios, apesar de tal procedimento ser também controverso devido à dificuldade na interpretação. Embora a biópsia tenha sido amplamente empregada, os resultados mostram inadequações. As queimaduras nem sempre são colonizadas e a seleção dos sítios da biópsia é importante. Este conceito levou ao emprego de uma variedade de técnicas para estimar em que profundidade os microrganismos se disseminam. Tais métodos incluem uma variedade de técnicas histopatológicas e microbiológicas.

Cultura e bacterioscópico quantitativo - o esfregaço e a cultura quantitativa são realizadas com biópsias removidas cirurgicamente da queimadura. Enquanto alguns preferem no mínimo 0,5g de tecido outros aceitam uma porção menor. Escolhe-se uma área com sinais de infecção, após limpeza do local retira-se um fragmento de tecido vivo que deve ser acondicionado em recipiente estéril.

No laboratório a biópsia é pesada, empregando-se balança com precisão de 0,001 g. O tecido então é homogeneizado em caldo ou salina com volume conhecido utilizando-se um liquidificador ou homogeneizador elétrico. O material é diluído à razão de 10 até 10^{-5} (peso/vol.) e semeado em vários meios de cultura, incluindo o ágar sangue e ágar Mac Conkey e em casos suspeitos cultura para bactérias anaeróbias estritas. Os germes isolados são identificados e submetidos a estudos de sensibilidade. E o valor quantitativo de cada microrganismo isolado é calculado a partir do peso inicial da biópsia e da diluição empregada.

Os métodos para testar a sensibilidade de drogas de uso tópico foram desenvolvidos, porém não são de emprego rotineiro por falta de padronização e porque o significado clínico continua duvidoso.

O bacterioscópico quantitativo pode ser realizado ao mesmo tempo, segundo o método desenvolvido por Magee e cols. Uma quantidade conhecida do homogeneizado é espalhada por uma área total de 1 cm² em uma lâmina e deixado para secar. A coloração é feita e 10 campos são examinados com objetiva de imersão com aumento de 100 vezes. Uma série de cálculos permite a determinação de contagem bacteriana em termos de microrganismos por grama de tecido.

Técnicas histopatológicas - as técnicas histopatológicas foram usadas para detectar infecções fúngicas e na tentativa de localizar o microrganismo no tecido queimado.

Os métodos histopatológicos apresentam uma série de desvantagens:

- A quantidade do tecido examinado é muito pequena sendo limitado para pequenos cortes feitos a partir de biópsia.

- O reconhecimento do germe em corte histológico é muito mais difícil em lâminas coradas necessitando de microscopista experiente.
- A concentração bacteriana necessária para permitir seu reconhecimento embora ainda não estabelecida parece ser ao redor de 10⁵ UFC ou mais por grama de tecido.
- O método histopatológico necessita de cultura simultânea para obter a identificação e o antibiograma dos microrganismos.

Embora a correlação entre cultura e exame histopatológico, em geral, seja boa, às vezes ocorrem discrepâncias.

FERIDAS CIRÚRGICAS: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

A infecção em ferida cirúrgica ocorre quando a mesma é contaminada com microrganismos, geralmente em período intra-operatório ou imediatamente no peri-operatório. A fonte de bactérias pode incluir sítios colonizados do corpo dos pacientes, tais como, as narinas, cavidade oral, trato genital feminino, trato alimentar e a pele. A equipe médica e de enfermagem representam fonte potencial de infecção assim como o ambiente do hospital.

Os fatores de risco do hospedeiro que podem contribuir para a patogênese da infecção cirúrgica incluem obesidade, diabetes melitus, insuficiência vascular e imunodeficiências. Os fatores microbiológicos incluem a carga microbiana e a virulência de cada germe. Podem contribuir para a probabilidade da infecção fatores cirúrgicos e pré-operatórios, tais como a duração da operação, intercorrências levando a contaminações, condições hemodinâmicas com baixa perfusão tecidual, má hemostasia, presença de corpo estranho e de tecido desvitalizado. Para iniciar uma infecção na presença desses fatores de risco, a carga infectante do agente infeccioso, é muito menor que a necessária para causar infecção em tecido saudável.

A taxa de infecção varia em função do grau de contaminação do sítio cirúrgico. O procedimento cirúrgico pode ser classificado como limpo, potencialmente contaminado, contaminado e infectado. Nesta classificação o risco de infecção pós-operatória está implícito. Além disso, as infecções de sítios remotos, por exemplo, infecção do trato urinário, coloca o paciente em cirurgia num alto risco de infecção pós-operatória.

Os principais patógenos são: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., etc. Algumas feridas que parecem infectadas podem não apresentar patógeno em cultura, enquanto outras apresentarão crescimento de múltiplas espécies.

As feridas superficiais começam freqüentemente na sutura e podem apresentar dor, calor, edema e rubor. O pús pode exsudar-se, principalmente quando são removidos um ou mais pontos para permitir a livre drenagem. A exsudação mal cheirosa pode sugerir presença de bactérias anaeróbias, mas também pode resultar de outras bactérias como *Proteus* spp.

Os microrganismos como *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum* podem causar infecção, complicando a cirurgia cardíaca ou mamoplastia, cirurgia ocular e outras cirurgias limpas. Tais microrganismos podem causar doenças crônicas desfigurantes.

Diagnóstico Laboratorial

O volume do pús aspirado ou o swab pesadamente impregnado com o pús pode ser examinado microbiologicamente. O esfregaço e a coloração do Gram poderá dar algumas indicações da variedade da flora infectante. Alguns laboratórios fazem de rotina a cultura do exudato de ferida superficial para germes aeróbios e facultativos em ágar sangue e ágar Mac Conkey assim como cultura em caldo. Cultura para bactérias anaeróbias de feridas superficiais na ausência clínica é caro e improdutivo.

Material purulento de feridas profundas ou de feridas que mostram bolhas de gás deve ser cultivado para germes anaeróbios assim como para aeróbios e facultativos.

O *Mycobacterium chelonae* e o *Mycobacterium fortuitum*, embora classificados como micobactérias de crescimento rápido e capazes de crescer em meios simples, geralmente necessitam de uma a seis semanas para crescer em cultura primária. Tais microrganismos especialmente *M. chelonae*, pode ser

erradamente identificado como difteróide numa cultura em caldo, a menos que se realize coloração para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes.

Quando se relata isolamento de microrganismos em feridas infectadas é essencial levar-se em conta a origem da amostra clínica. Assim, todos os estafilococos coagulase-negativa isolados de feridas de esternotomia infectadas ou associados com cirurgia vascular ou de implante ortopédico, devem ser considerados como potencialmente patogênicos fazendo-se o antibiograma.

Inversamente, baixo número de estafilococos coagulase negativa associado com flora entérica em ferida infectada de incisão no cólon deveria ser descartada não devendo realizar antibiograma neste caso. A razão dessa conduta é que tal microrganismo não constitui problema clínico e irá desaparecer quando outros patógenos forem eliminados.

Diagnóstico de Infecção de Feridas Cirúrgicas

Infecções	Agente Etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Infecção pós-operatória simples	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus</i> grupo A, Enterobactérias, Enterococos, <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	Gram, Cultura do pús, aspirado ou tecido em ágar Sangue, ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato empregando cultura em aerobiose e meio seletivo para anaeróbios em ambiente de anaerobiose estrita.
Infecção de feridas complicadas	<i>Streptococcus</i> grupo A, <i>Staphylococcus aureus</i> , Enterobactérias, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., cocos anaeróbios, cocos microaerófilos, <i>Fusobacterium</i> spp.	Gram, Cultura em aerobiose, em jarra de anaerobiose e microaerofilia (método da vela) do pús ou tecido. Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato, Ágar enriquecido e seletivo para anaeróbios estritos.

INFECÇÕES COMPLICADAS E LESÕES CAUSADAS POR MORDEDURA: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

INFECÇÕES COMPLICADAS

As infecções complicadas da pele e de estruturas subjacentes podem ocorrer após cirurgia ou trauma.

A classificação dessas infecções é difícil devido à superposição do sítio anatômico afetado, ao microrganismo responsável e à manifestação clínica. Muitas destas infecções são graves, de progressão rápida, e associadas com altas taxas de mortalidade.

A gangrena infecciosa é doença rara onde as necroses bolhosas da pele podem estar associadas com bacteremia e lesões metastáticas. Esta doença é freqüentemente fatal. A gangrena sinérgica, às vezes referida como "gangrena de Meleney", é em geral uma complicação da cirurgia do trato alimentar. Tal infecção inicia-se como uma úlcera próxima à ferida e pode se disseminar para afetar mais a parede abdominal anterior. A gangrena gasosa está geralmente associada com *Clostridium perfringens*, microrganismo que tanto pode colonizar a ferida sem causar doença como pode causar celulite grave, estender-se para a musculatura evoluindo para mionecrose e, com freqüência, para o óbito.

Esta infecção pode estar mais associada com supuração aquosa e fina do que com exsudato purulento. Uma síndrome semelhante de necrose muscular pode ser causada por *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio vulnificus*, enquanto a celulite pode ainda ser causada por *Vibrio* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* e/ou outros anaeróbios que não *Clostridium* spp. tais como *Bacteroides* spp. e cocos.

A fasciite necrotizante inicia-se geralmente como ferida cirúrgica do abdômen e dissemina-se lateralmente para os flancos, até a linha de mamilo e desce para a região inguinal. O tecido que recobre a pele parece normal no início da doença, tornando-se vermelho azulado conforme a doença progride. O pús pode ser drenado através da pele dos flancos ou de outras partes da ferida original. A "doença de Fournier" é uma forma de fasciite necrotizante que afeta a região do períneo ou escroto, onde as camadas superficiais da pele enegrecem e descamam. Pode haver envolvimento de bactérias

anaeróbias como *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp. e cocos Gram-positivos, bem como bactérias facultativas como Enterobactérias, estafilococos, enterococos. Os estreptococos microaerófilos são vistos freqüentemente em sinergia gangrenar ou associados com *S. aureus* e membros da família Enterobacteriaceae.

A infecção pode se complicar e estender-se para os músculos da perna quando há comprometimento vascular, assim como em pacientes com diabetes mellitus. Pode existir mionecrose extensiva causada por anaeróbios como *Clostridium* spp., cocos anaeróbios e *Bacteroides* spp. em área de insuficiência vascular. A flora facultativa também pode estar presente, incluindo *Proteus* spp.

Diagnóstico Laboratorial

As bactérias comumente isoladas de feridas infectadas incluem *S. aureus*, *S. pyogenes* (grupo A), cocos anaeróbios, *Clostridium* spp., especialmente *C. perfringens*, membros da família Enterobacteriaceae, *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp.

Para pesquisa laboratorial eficiente necessita-se da coleta de volume adequado (até 5mL) de aspirado de pús ou biópsia de tecido. As amostras clínicas líquidas podem ser transportadas em tubos para transporte de anaeróbios ou sacos plásticos com ambiente anaeróbio; se não houver disponibilidade de nenhum desses meios de transporte, pode-se utilizar a própria seringa onde se colheu o material clínico, enviando-se o material o mais rápido possível ao laboratório. Recomenda-se processar o material dentro da primeira hora.

Os cortes de tecido devem ser enviados ao laboratório em tubo com salina para manter a umidade. Tecidos para análise microbiológica não devem ser colocados em formol, podendo ser colocados em meio de transporte.

A coloração de Gram pode indicar uma variedade de microrganismos associados com a lesão e uma terapia presuntiva poderá ser guiada pelo resultado do Gram. No caso particular da mionecrose causada por *C. perfringens*, o agente pode ser facilmente reconhecido por sua morfologia de bacilo Gram-positivo típico com extremidade angular. Nestes casos nota-se pouca quantidade de pús na amostra.

As amostras podem ser cultivadas em ágar sangue ou ágar Mac Conkey. Os germes facultativos comuns irão aparecer em 24 horas. O exame microbiológico de todas essas infecções requer cultura para bactérias anaeróbias, assim como para aeróbios e anaeróbios facultativos.

Diagnóstico de Infecções Complicadas

Quadro Clínico	Agente Etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Fasciite Necrotizante	<i>S. pyogenes</i> ou anaeróbios associados a bactérias facultativas	Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato.
Gangrena de Fournier	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Enterococcus</i> spp., anaeróbios estritos, etc.	Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Caldo tioglicolato.

INFECÇÕES COMPLICADAS POR MORDEDURAS

Os ferimentos de mordeduras tanto de humanos como de animais podem ser contaminados com a flora oral do agressor, assim como podem ser causados por traumas relacionados à cavidade oral, tendo como primeiras lesões as causadas por dentadas ou decorrentes de mastigação.

Diagnóstico Laboratorial

A cultura de mordedura recente não está indicada, pois o seu resultado não tem aplicação clínica. O melhor material para cultura é geralmente o pús aspirado da profundidade da ferida ou a cultura feita durante a incisão e drenagem desta amostra ou debridamento da ferida infectada. Deve-se realizar cultura tanto para bactérias aeróbias quanto para anaeróbias com uma variedade de meios de cultura para auxiliar na separação prévia dos microrganismos misturados.

Diagnóstico de Lesões Causadas por Mordeduras

Mordeduras	Agente Etiológico	Diagnóstico Laboratorial
Mordedura de animais	<i>Pasteurella multocida</i> (cão e gato), <i>Streptobacillus moniliformis</i> (rato), Anaeróbios, <i>Capnocytophaga</i> spp. (cão), <i>Staphylococcus aureus</i> (cão e gato)	Gram, Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Hemocultura
Mordedura e arranhadura de Gatos	<i>Bartonella henselae/quintana</i>	Histologia, cultura em ágar sangue com 5-10% CO ₂ . PCR
Mordeduras humanas	<i>Streptococcus viridans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Capnocytophaga</i> , Anaeróbios estritos, etc.	Gram, cultura de aeróbios em Ágar sangue, Ágar Mac Conkey, Ágar chocolate e cultura em anaerobiose em meio enriquecido e seletivo para anaeróbios.

4. INFECÇÕES INTESTINAIS

INTRODUÇÃO

A doença diarréica continua a figurar como o maior problema da saúde humana. Foi estimada uma ocorrência de um bilhão de episódios de diarréia no mundo por ano em crianças abaixo de cinco anos de idade, resultando em 5 milhões de óbitos. A diarréia é particularmente devastadora em crianças que sofrem concomitantemente de doenças infecciosas, como sarampo, imunodeficiência e subnutrição protéica, fatores muito freqüentes nos países em desenvolvimento. Em tais países, estima-se que a criança apresenta três a quatro vezes mais episódios de diarréia por ano do que as que vivem em países de elevado nível de saneamento básico e com sistemas adequados de suprimento de água.

Embora a morbidade e a mortalidade devido à doença diarréica sejam mais importantes em crianças lactentes, esta enfermidade tem impacto importante também em adultos. Os adultos em média sofrem de um a dois episódios de diarréia anualmente. Este fato resulta em custos econômicos devido à utilização das fontes de recursos para saúde e perda da produtividade.

As causas das síndromes gastrointestinais acompanhadas de dor, diarréia ou desinteria podem ser:

- Infecciosas, causadas por bactérias, fungos (menos freqüentes), vírus, parasitas e protozoários.
- Não infecciosas, alérgicas, causadas por erro alimentar, envenenamento, etc.

O custo para se fazer um exame de fezes de qualquer paciente para todos os patógenos em potencial descritos na literatura é proibitivo. Devem ser desenvolvidas estratégias para assegurar a maior taxa de positividade possível, uma vez que a coprocultura tem um custo alto por resultado positivo.

A identificação daqueles casos de doenças diarréicas causadas por agentes que necessitam de terapia que não seja apenas a hidratação oral é de particular importância. Também é importante identificar o agente etiológico responsável por surtos de toxinfecção alimentar, para que as técnicas de manuseio alimentar possam ser notificadas para prevenir transmissões posteriores.

A maioria dos casos de diarréia comunitária em adultos é de causa inflamatória e, as fezes, podem ser triadas para verificar a presença de leucócitos através da coloração de azul de metileno. Entretanto, a sensibilidade da pesquisa de leucócitos nas fezes é menor que 90%. A ausência de leucócitos não poderá descartar agentes causadores de diarréia inflamatória, mas a presença destes pode diferenciar dos agentes causadores de diarréia não inflamatória, incluindo microrganismos toxigênicos como Vibrios, *E. coli* (ETEC), agentes virais e certos agentes parasitários.

Nos meses de inverno, as crianças com diarréia devem ser triadas primeiro para Rotavírus e, somente quando o exame for negativo, as amostras fecais devem ser testadas para outros patógenos bacterianos.

Estudos de vigilância realizados por Laboratórios de Referência, como triagem de fezes para vários agentes por um período de 3 a 6 meses e a avaliação do impacto destes estudos na taxa de positividade do exame de fezes, poderão auxiliar na determinação de quais microrganismos deverão ser incluídos na triagem de rotina pelos laboratórios que atendem a comunidade.

Um outro papel importante que o laboratório desempenha no controle da diarréia de pacientes da comunidade é na detecção de surtos de fontes comuns. O laboratório deve notificar as autoridades da Saúde Pública toda vez que houver crescente isolamento de patógenos entéricos. Por exemplo, em muitas instituições infantis como a creche, o isolamento de mais de um caso de *Shigella* spp. em crianças menores de cinco anos de idade, dentro de um período de uma semana, poderá sugerir um surto de shigelose.

A diarréia de origem hospitalar é descrita na literatura como um episódio que ocorreu após três dias de internação. Esta definição é razoável quando se reconhece que certos pacientes, serão admitidos no hospital devido a sintomas de diarréia (especialmente em crianças pequenas) ou pode ter episódio de diarréia auto-limitada, geralmente induzida por vírus durante ou próximo ao momento da internação.

Em crianças, o Rotavírus é a causa principal de infecção hospitalar sendo este o único agente para o qual as fezes de crianças com diarréia desenvolvida no hospital devem ser rotineiramente

pesquisadas. Em adultos, os estudos têm mostrado que o *Clostridium difficile* é o único agente bacteriano confiavelmente detectado em fezes de pacientes com diarreia de origem hospitalar.

Deve-se entender também que alguns pacientes, particularmente os imunocomprometidos e em destaque os portadores de HIV, podem estar infectados com mais que um agente e que o encontro de um agente infeccioso não exclui a possibilidade da presença de outros; assim, o exame deve ser realizado de forma completa.

PRINCIPAIS CAUSAS INFECCIOSAS DE DESINTERIA

Evacuação acompanhada de tenesmo, sangue, muco e dor	<ul style="list-style-type: none"> - Desintéria bacilar: <i>Shigella</i> spp., <i>E. coli</i> (EIEC) - <i>Campylobacter jejuni</i> - Desintéria amebiana: <i>Entamoeba histolytica</i> - Outros protozoários: <i>Balantidium coli</i>, <i>Giardia lamblia</i> - Parasitas: <i>Schistosoma mansoni</i>, <i>Strongyloides stercoralis</i>, <i>Trichinella spiralis</i>, <i>Cyclospora</i> spp., <i>Microsporidium</i> spp. - <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - Febre tifóide: <i>Salmonella typhi</i> e outras Salmoneloses - Yersiniose - <i>Yersinia enterocolitica</i> - Proctite gonorréica, sífilítica, por <i>Chlamydia</i> e herpética
Diarréia	<ul style="list-style-type: none"> - Intoxicação alimentar por <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Clostridium perfringens</i>, <i>Clostridium botulinum</i> - <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) - <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) - <i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC) - <i>E. coli</i> entero-agregativa (EaggEC) - <i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC) - Enterocolite necrotizante do recém-nascido, enterocolite pseudomembranosa (<i>Clostridium difficile</i>), diverticulite, <i>tiflite</i> ou <i>enterocolite do neutropênico/imunossuprimido</i> - <i>Helicobacter pylori</i> - Rotavírus - Norwalk vírus

Nas últimas duas décadas o conhecimento sobre agentes virais, bacterianos e protozoários e os mecanismos pelos quais a diarreia é produzida (induzida) expandiu-se bastante. Por exemplo:

- Retocolite ulcerativa e doença de Crohn.
- Diarreia crônica causada por *Cryptosporidium* spp. e por *Isospora* spp., reconhecidos como um dos maiores problemas em pacientes aidéticos
- Surtos de diarreia devido à contaminação da rede de água pública com *Giardia lamblia*.

A detecção do patógenos entéricos bacterianos é complicada pela presença de microflora fecal normal abundante e complexa. Tal flora aparece logo após o nascimento, envolvendo o intestino grosso durante o primeiro mês de vida, principalmente em resposta à mudança da dieta alimentar. Por volta do primeiro aniversário, a microflora intestinal é totalmente estabelecida e permanece durante a vida inteira, a menos que seja induzida uma grande mudança pela terapia antimicrobiana.

A flora fecal obtida de adulto normal contém entre 10^{11} - 10^{12} microrganismos por grama de fezes, das quais 99% são anaeróbios estritos, predominantemente os pertencentes aos gêneros: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Propionibacterium*. Quando comparados com a microflora fecal facultativa, esta é mais modesta em número e variedade, com 10^8 - 10^9 organismos por grama de fezes.

O desafio para o microbiologista clínico é a tentativa de detectar vários enteropatógenos em meio incrivelmente complexo. As infecções intestinais ocorrem em função de fatores ligados ao hospedeiro, como baixa acidez gástrica que reduz significativamente a dose infectante, como sua microbiota, imunidade, motilidade, etc. E fatores ligados ao agente, destacando-se os fatores de virulência e inóculo.

Dose infectante de patógenos intestinais

<i>Shigella</i>	10 – 10 ² UFC/ml
<i>Campylobacter jejuni</i>	10 ² – 10 ⁶ UFC/ml
<i>Salmonella</i>	10 ⁵ UFC/ml
<i>E. coli</i>	10 ⁸ UFC/ml
<i>Vibrio cholerae</i>	10 ⁸ UFC/ml
<i>Giardia lamblia</i>	10 – 10 ² cistos
<i>Entamoeba histolytica</i>	10 – 10 ² cistos
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1 – 10 ³ oocistos

ESCHERICHIA COLI

As cepas mais importantes com potencial de causar diarreia são: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou produtora de toxina Shiga, *E. coli* enterotoxinogênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC). Outras *E. coli* produtoras de toxina e outros fatores de virulência, como a *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) foram descritas, mas de importância clínica ainda não bem definida.

EHEC - *E. coli* produtoras de toxina Shiga (verocitotoxina) características são a O157:H7, mas mais de uma centena de outros sorotipos podem produzir esta toxina. A *E. coli* O157:H7 é a mais bem estudada e esta relacionada a síndrome hemolítico urêmica, caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica e insuficiência renal aguda. Em geral é encontrada em produtos de origem animal como carne, leite e derivados, mas pode também ser disseminada através de água não clorada, alimentos, etc. Dose infectante é baixa, por isso pode ser transmitida de pessoa a pessoa. A sorotipagem é o método de triagem mais comum, existindo antisoro específico para O:157 (simples) ou teste com partículas de latex, devendo a cepa ser enviada ao laboratório de referência para confirmação.

ETEC - *E. coli* produtoras de enterotoxinas LT e ST, não são distinguidas de outras *E. coli* por métodos bioquímicos e sua caracterização somente é realizada por laboratórios de referência, o que dificulta seu diagnóstico. É comum em crianças e uma das causas da diarreia dos viajantes. Raramente encontrada em surtos.

EPEC - As *E. coli* enteropatogênicas conhecidas como clássicas, são dezenas de sorotipos de *E. coli* não produtoras de enterotoxina e não invasoras, que são causa frequente de diarreia em crianças em países em desenvolvimento, podendo ocorrer em surtos hospitalares. O quadro clínico característico é a diarreia severa, não sanguinolenta, prolongada, associada à má-absorção e desnutrição. O diagnóstico é realizado por triagem com soros polivalentes contendo anticorpos contra antígenos somáticos (O) e capsulares (K) específicos para os sorotipos prevalentes. Existem comercialmente soros monovalentes para caracterização específica. A sorotipagem pode dar resultado falso positivo, que pode ser reduzido com sorologia para antígenos H ou provas de virulência em laboratórios de referência.

EIEC - São *E. coli* que invadem as células epiteliais do cólon, causando síndrome semelhante à causada pela *Shigella* com diarreia aquosa, cólica e eventualmente diarreia sanguinolenta. São menos frequentemente isoladas que as *E. coli* anteriormente descritas. Em geral as cepas são lisina desaminase negativas e imóveis. Existem comercialmente soros polivalentes e monovalentes contra os sorotipos prevalentes. A duração do período de incubação pode sugerir alguma etiologia específica principalmente quando há surtos.

Sintomas associados a patogenia da doença diarréica

Variável	Produção de Toxina	Invasão Tecidual
Consistência das fezes	Aquosa	Amolecida
Volume fecal	Grande	Pequena
Vômito	Presente	Ausente
Febre	Ausente	presente
Desidratação	Importante	Leve
Sintomas após inoculação	Poucas horas a 2 dias	1 a 3 dias
Leucócitos nas fezes	Negativo	presentes
Sangue e muco nas fezes	Negativo	presentes
Local de infecção	Intestino delgado	Intestino grosso

A procura do agente etiológico de diarréia, disenteria ou dor abdominal, deve-se contar com a colaboração importante do médico, dando informações clínicas e se possível a suspeita clínica para orientar quais os agentes a serem pesquisados. Constituem informações importantes:

- Idade do paciente
- Principais sintomas: diarréia, presença de sangue, pus ou muco, tenesmo, dor abdominal, frequência e volume das evacuações, febre, quadro simultâneo em outras pessoas do convívio.
- É imunossuprimido? Diarréia após uso de antibióticos? etc.
- Pedido específico quando suspeitar de agentes como cólera e campylobacter.
- No exame proto-parasitológico é necessário especificar a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli*.

ASSOCIAÇÕES ENTRE OS ASPECTOS CLÍNICOS E OS AGENTES ETIOLÓGICOS

- **Ingestão de frutos do mar:** em especial ostras, induz a pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, e vírus Norwalk.
- **Viagem a países tropicais:**
 - sem leucócitos nas fezes: *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC), Rotavírus e Norwalk vírus, ou parasitas.
 - com leucócitos nas fezes: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* (EIEC), *Campylobacter jejuni* e *Entamoeba histolytica*.
- **Disenteria** (muco, sangue e pus, com dor a evacuação): amebíase, shigelose, *E. coli* (EIEC).
- **Fezes com sangue, sem leucócitos fecais:** deve-se suspeitar de EHEC (O157:H7), pode estar acompanhada de síndrome hemolítico-urêmica, principalmente em crianças. Existe a possibilidade de amebíase.
- **Diarréia sanguinolenta com leucócitos:** salmonelose, campilobacteriose, shigelose e *E. coli* (EIEC).
- **Diarréia secretória**, cujo quadro importante é a desidratação podendo evoluir para o choque e cujas fezes apresentam aspecto de água de arroz, sugerindo o diagnóstico de cólera.
- **Diarréia e vômito significativo**, em crianças pequenas sugere Rotavírus.
- **Diarréia crônica ou subaguda**, com ou sem flatulência, pode-se direcionar o exame para o diagnóstico de giardíase. Outras causas de (>10 dias), com perda de peso, lembrar de ciclosporiase e criptosporidiose. Ou na suspeita de uma síndrome apendicular pode-se sugerir uma yersiniose.

- **Intoxicação com incubação de curta duração**, acompanhado de vômito, pode-se sugerir uma intoxicação de origem alimentar causada por toxina de *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus*.
- **Dor abdominal** sugerindo apendicite, lembrar de *Yersinia enterocolítica*.
- **Diarréia acompanhada de artrite**: *Yersinia enterocolítica*
- **Em pacientes imunossuprimidos** considerar:
 - Vírus: Citomegalovírus, *Herpes simplex* vírus, vírus Coxsackie, Rotavírus,
 - Bactérias: *Salmonella* spp., complexo *Mycobacterium avium*
 - Parasitas: *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Entamoeba coli*, e *Giardia lamblia*.
- **Em surtos de gastroenterocolite**, deve ser considerada a presença dos seguintes patógenos: *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *Cryptosporidium* spp., ETEC, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., EIEC e *Cyclospora* spp. Na toxi-infecção alimentar, a doença resulta da ingestão direta de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado, sendo os exemplos mais comuns o *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico, *B. cereus* e *C. perfringens*.
- **Gastroenterite viral** é a segunda maior causa de doença em países desenvolvidos, após as infecções virais do trato respiratório; e o Rotavírus é a maior causa de gastroenterite viral em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Mecanismos de patogenicidade dos principais agentes de diarréia

Produção de Toxina	Invasão	Adesão
<i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus cereus</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>E. coli</i> enteropatogênica
<i>Clostridium difficile</i> , <i>C. perfringens</i>	<i>E. coli</i> enteroinvasora	<i>E. coli</i> enteroaderente
<i>E. coli</i> enterotoxinogênica ETEC	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
<i>E. coli</i> enterohemorrágica EHEC	<i>Salmonella</i> spp.	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella</i> spp.	
<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Doenças gastrointestinais de origem alimentar (alimentos e água)

Bactérias

Agente etiológico	Início dos sintomas	Dados clínicos mais comuns	Diagnóstico
<i>Bacillus cereus</i> - toxina de vômito	1-6 h	Vômitos, diarréia ocasional; Comum em surtos de toxi-infecção alimentar.	Isolamento nas fezes ou no alimento: 10^5 UFC/g. <i>Bacillus cereus</i> (Seletive Medium Oxoid).
<i>Bacillus cereus</i> - toxina de diarréia	6-24 h	Diarréia e dor abdominal.	Idem
<i>Campylobacter</i>	2-5 até 10 d	Diarréia geralmente sanguinolenta, dor abdominal e febre.	Coprocultura em meio específico (Karmali).
<i>Clostridium botulinum</i>	2 h a 8 d média: 12-48h	Distúrbios visuais, fraqueza progressiva, com paralisia descendente e bilateral. Sem diarréia.	Pesquisa de toxina no soro, fezes, coprocultura.
<i>Clostridium perfringens</i>	6-24 h	Diarréia, cólicas abdominais.	Isolamento nas fezes ou no alimento $> 10^5$ UFC/g.

<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC) O157:H7	1-10 d média: 4-5 d	6% das crianças com síndrome hemolítico-urêmica, adultos. Púrpura trombocitopênica e insuficiência renal aguda; diarreia sanguinolenta é característica, fortes cólicas abdominais.	Isolamento de <i>E. coli</i> O157:H7 nas fezes e/ou alimento – (soroaglutinação) CHROMagar O157.
<i>E. coli</i> enterotoxinogênica (ETEC)	6-48 h	Diarreia, náuseas, cólicas abdominais.	Coprocultura para isolamento e testes p/ enterotoxina ST/LT.
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	Variável	Diarreia, febre, cólicas abdominais.	Coprocultura para isolamento e sorotipagem.
<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Variável	Diarreia que pode ser sanguinolenta, febre, cólicas abdominais.	Coprocultura para isolamento e sorotipagem.
<i>Listeria monocytogenes</i> – forma diarreia	9-32 h	Diarreia, febre, cólicas abdominais.	Coprocultura em caldo de enriquecimento (caldo Fraser, caldo Listeria-Oxoid) e meio seletivo (Listeria Seletive Medium / Oxoid).
<i>Salmonella typhi</i>	3-60 d média: 7-14 d	Febre, anorexia, indisposição, cefaléia, mialgia, diarreia e constipação podem se alternar.	Coprocultura em caldo de enriquecimento e meios seletivos; títulos de anticorpos específicos.
Outras salmoneloses	6-10 d média: 6-48 h	Diarreia, em geral com febre e cólicas abdominais.	Coprocultura em caldo de enriquecimento e meios seletivos Salmonella-Shigella, Hektoen.
<i>Shigella</i> spp.	12 h a 6 d média: 2-4 d	Diarreia com tenesmo, muco, múltiplas evacuações de pequeno volume, cólicas e febre.	Coprocultura com caldo de enriquecimento e meios seletivos (Salmonella-Shigella).
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 min. a 8 h média: 2-4 h	Vômitos e diarreia. Comum em surtos de toxi-infecção alimentar.	Coprocultura em meio seletivo (Baird-Parker, Vogel-Johnson ou Ágar manitol sal) e demonstração de toxina.
<i>Vibrio cholerae</i> e outros	1-5 d	Diarreia aquosa geralmente acompanhada de vômitos.	Coprocultura em meio seletivo (Ágar TCBS) e isolamento de cepa produtora de toxina.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4-30 h	Diarreia.	Coprocultura em meio TCBS.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1-10 d média: 4-6 d	Diarreia e dor abdominal geralmente severa.	Isolamento em meio seletivo ou Salmonella-Shigella com incubação em geladeira.

Vírus

Agente etiológico	Início dos sintomas	Dados clínicos mais comuns	Diagnóstico
Rota vírus	15-77 h média: 1-2 d	Início súbito, com vômitos e diarreia, principalmente em crianças, ocasionalmente dor abdominal e sintomas respiratórios. Surtos hospitalares.	Testes por aglutinação com partículas de látex ou Elisa Imunoensaio (EIA) com anticorpos poli ou monoclonais.

Norwalk (calicivírus) e outros enterovírus	15-77 h média: 1-2 d	Vômitos, cólicas, diarreia e cefaléia.	Laboratórios de Saúde Pública. Enviar fezes conservadas a menos 20°C.
---	-------------------------	--	--

Parasitas

Agente etiológico	Início dos sintomas	Dados clínicos mais comuns	Diagnóstico
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2-28 d média: 7 d	Diarreia, náusea, vômito e febre.	Pesquisa com Ziehl modificado ou imunofluorescência / Elisa.
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	1- 11 d média: 7 d	Fadiga, diarreia insidiosa.	Pesquisa nas fezes.
<i>Giardia lamblia</i>	3-25 d média: 7 d	Diarreia, flatulência, cólicas, náuseas e fadiga.	Fezes, aspirado duodenal ou biópsias - pesquisa direta ou técnica imunológicas.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- Uma história de emprego recente de antibioticoterapia prolongada deve ser considerada para direcionar a pesquisa de toxina de *Clostridium difficile* como uma das etiologias. Outras possibilidades são o *S. aureus*, *Candida* spp. e *P. aeruginosa*.
- Os antibióticos mais frequentemente associados à diarreia por *C. difficile* são: cefalosporinas, ampicilina, amoxicilina, outros derivados de penicilinas, macrolídeos, tetraciclina e sulfazotrim.
- Quando possível selecionar porções de fezes contendo muco, e/ou sangue e/ou pús.
- A pesquisa de eosinófilos no muco positiva é sugestiva de diarreia de causa alérgica.
- Diarreia por toxina tem curta duração, pesquisa de leucócitos, sangue e presença de muco negativa. Diagnóstico laboratorial difícil, pois o agente costuma não estar presente.
- Para cultura de *Campylobacter* há necessidade de meio de cultura específico.
- Pesquisa de leucócitos e eosinófilos: deve-se enviar fezes frescas para exame (não swab) ou em meio de transporte.

MEIOS DE TRANSPORTE

- Salina glicerizada e tamponada é indicada para *Salmonella* e *Shigella*.
- Cary Blair é indicado para todos os patógenos bacterianos intestinais, exceto *Shigella*. No caso do *Clostridium difficile*, as fezes devem ser congeladas a menos 20°C ou submetidas ao teste rapidamente.
- Fezes e aspirados gastrointestinais podem ser transportados sob refrigeração em frascos estéreis, e biópsias podem ser conservadas com um pouco de salina em frasco estéril. Em geral o meio de transporte inviabiliza a pesquisa de leucócitos nas fezes, sugestivo de agente invasor.
- Materiais inapropriados para processamento: fezes ou material do trato digestivo transportado a temperatura ambiente sem meio de transporte, swab seco ou sem sinais de fezes, biópsias secas.

Quando não houver informações clínicas ou pedido específico, a rotina recomendada é a pesquisa dos seguintes agentes:

- *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Yersinia*: podem ser isolados em Mac Conkey e Salmonella-Shigella. Recomenda-se também incluir a cultura para *Campylobacter*, que exige meio específico. No caso de fezes com sangue, pesquisar EHEC.
- Em coprocultura de crianças até 1 ano considera-se rotina a pesquisa de *Salmonella*, *Shigella*, EPEC, (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora) e EHEC (*E. coli* enterohemorrágica). Deve-se incluir também a pesquisa de *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*.

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS MEIOS SÓLIDOS

- Ágar Mac Conkey e Ágar Eosin Metilene Blue (EMB) são meios diferenciais, mas não seletivos entre os Gram negativos entéricos.
- O Ágar Salmonella-Shigella funciona bem para para as *Salmonella* mas pode inibir Shigella.
- O Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) é recomendado para *Salmonella* e *Shigella*, mesmo as mais exigentes.
- Ágar Hektoen entérico (HE) é adequado para *Salmonella* e *Shigella*
- Ágar verde brilhante (VB) é seletivo para *Salmonella sp*, mas não é indicado para *Salmonella typhi* e *S. paratyphi*.
- Ágar sulfito de bismuto (Wilson & Blair) é seletivo para *Salmonella*.

Caldos de enriquecimento:

Indicado para detectar baixo número de Salmonella ou Campylobacter em portadores. Muitos laboratórios estão abandonando o uso de caldos de enriquecimento pela baixa recuperação de patógenos.

Caldo GN (Gram Negativo) - enriquecimento de Salmonella e Shigella spp Caldo Selenito F - principalmente Salmonella spp Caldo tetracionato - apenas algumas espécies de Salmonella spp e exclui *S. typhi*.

Campy-tioglicolato - apenas para pesquisa de portadores de *C. jejuni* Salina fosfatada e tamponada pH 7,6 - para semear fezes e conservar em geladeira por três semanas para pesquisa de portadores de Yersinia enterocolitica, mas não indicado para rotina.

RELATÓRIO DE RESULTADOS

Com o reconhecimento do número crescente de agentes bacterianos causadores de diarreia, tornou-se importante a identificação específica de microrganismos para o qual as amostras fecais são examinadas.

- É incorreto emitir o resultado como "não foram isolados patógenos", se as fezes foram cultivadas somente para recuperar alguns patógenos. Ao invés disso o relatório deve afirmar "não foram isoladas *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*" ou para algum outro patógeno efetivamente pesquisado.
- O protocolo deverá prever também laudos relatando a ausência da flora fecal Gram negativa e a presença de quantidade significativa de microrganismos como *S. aureus*, leveduras e *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se as amostras fecais ou as cepas isoladas forem enviadas ao Laboratório de Referência para trabalho posterior, tais como pesquisa da presença de toxina de *C. difficile* ou sorotipagem de cepas de *Salmonella*, o relatório para os referidos exames deve incluir o nome do laboratório de referência e as provas realizadas (sorotipagem determinação das toxinas, etc.)

Procedimentos Gerais para o Isolamento dos principais Agentes Bacterianos de Infecção Intestinal

Microrganismo	Mecanismo de Patogenicidade	Técnica	Enriquecimento	Meios de cultura
<i>Campylobacter</i> , <i>C. jejuni</i>	Invasão	Culturas incubadas em ambiente de microaerofilia à 42°C.	não	Ágar p/ <i>Campylobacter</i> com suplementos de antibióticos como o meio de Skirrow, Campy-BAP(Blaser), etc.
<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica, <i>E. coli</i> Invasora	Enterotoxinas (LT e ST) - Invasão	24-48 h aerobiose, 35-37°C.	Não	Ágar Mac Conkey ou Ágar eosina azul de metileno.

<i>E. coli</i> enterohemorrágica O157:H7 e outras	Verotoxinas (toxina Shiga-like)	24-48h aerobiose, 35-37°C.	não	Ágar diferencial: Ágar Mac Conkey sorbitol (SMAC) ou Ágar Mac Conkey
<i>Salmonella</i> spp.	Invasão	24-48h aerobiose, 35-37°C.	Selenito F *, Caldo tetracionato *, Caldo GN *.	Ágar Salmonella-Shigella, Mac Conkey ou Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) ou Ágar Hektoen enterico (HE)
<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Toxina colérica Toxinas	24-48h aerobiose, 35-37°C.	Água peptonada alcalina por 6-12 h.	Ágar TCBS, cresce em Mac Conkey.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Invasão		Salina glicerinada tamponada à 4-5°C por três semanas, não recomendado.	Ágar Salmonella-Shigella, Ágar Mac Conkey e meio seletivo: Ágar cefsulodina-irgasan-novobiocina

* atualmente questiona-se a necessidade do uso de caldos de enriquecimento, ficando a critério de cada usuário.

5. INFECÇÕES ABDOMINAIS

AGENTES MICROBIANOS MAIS FREQUENTES

- Intrabdominais (peritonite pós-trauma de vísceras ocas): Enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp.), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., Anaeróbios (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp.).
- Abscesso intrabdominal: incluindo apendicite, diverticulite. As mesmas bactérias do item anterior, e ainda: *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., *S. pyogenes* e *Streptococcus* spp.
- Peritonite Bacteriana Espontânea Primária: Enterobactérias (2/3), *S. pneumoniae* (15%), enterococos (6-10%) e anaeróbios < 1%.
- Peritonite associada a diálise peritoneal crônica: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, enterobactérias e 20% estéril.
- Infecções hepáticas, incluindo abscessos: *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Entamoeba histolytica*, *Leishmania donovani* (kalazar), microsporidiose.
- Granuloma hepático: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Coxiella burnetii*, *T. pallidum* (sífilis secundária), *Echinococcus* spp., *Schistosoma* spp., Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr. Pacientes da América do Norte ou outros continentes pode-se incluir a *Francisella tularensis* e *Coccidioides immitis*.
- Infecções pancreáticas: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Trulopsis glabrata*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp., *Serratia marcescens*.
- Abscesso esplênico: os anteriores, e ainda *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Aspergillus* spp., *Leishmania donovani*, microsporidiose.

COLETA E TRANSPORTE DO MATERIAL

Estas amostras são habitualmente colhidas através de procedimentos invasivos: punções, laparoscopia ou durante ato cirúrgico. Deverão ser observados cuidados de assepsia para que a amostra coletada não seja contaminada. A secreção ou líquidos (peritoneal, ascítico) serão aspirados com o auxílio de agulha/seringa estéreis, colocados em frasco com meio de transporte para anaeróbios facultativos e estritos (caldo de tioglicolato) e encaminhados logo ao laboratório de microbiologia.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No laboratório de microbiologia, estas amostras serão processadas nas seguintes etapas:

- Avaliação da qualidade do material encaminhado: identificação adequada, frasco/meio de transporte correto, volume da amostra suficiente para os testes requeridos, data/horário da coleta.
- Coloração de Gram do esfregaço do material em lâmina: serão observados forma, coloração e agrupamento dos microrganismos, além da presença de células (leucócitos íntegros ou degenerados, inclusões bacterianas, etc). Se houver suspeita de microrganismos álcool-ácido resistentes, preparar também lâminas para coloração de Ziehl Neelsen e auramina, e na suspeita de fungos, preparação de azul de lactofenol ou de algodão e calcofluor.
- Semeadura em meios adequados:
 - Meios de cultura para bactérias aeróbias: Ágar sangue, Ágar Mac Conkey - incubar a 35°C durante 18 a 24 horas, verificar crescimento bacteriano em ambas as placas; se negativo, incubar mais 24 hs; se positivo, identificar o(s) microrganismo(s).

- Ágar chocolate suplementado - incubar a 35°C em jarra com 5% CO₂ durante 18 a 24 horas, verificando o crescimento bacteriano; se negativo, reincubar; se positivo, proceder a identificação do microrganismo.
- Meios de cultura para bactérias anaeróbias estritas: Ágar infusão de cérebro coração ou Brucella Ágar acrescido de vitamina K e hemina - incubar a 35°C em jarra com gerador de anaerobiose durante 48 hs; verificar crescimento; se negativo, repicar a amostra do tioglicolato suplementado com hemina e vitamina K a cada 48 h até completar 7 dias; se positivo, proceder à identificação da bactéria. Pode-se semear em paralelo em meio seletivo e enriquecido para anaeróbios como o Ágar sangue com hemácias rompidas, adicionado de Kanamicina e Vancomicina (LKV) seletivo para *Bacteroides* e *Prevotella*.
- Se houver suspeita clínica de micobactérias, semear também em meios especiais (Lowenstein Jensen ou Middlebrook); aguardar 60 dias para diagnosticar a cultura como negativa.
- Se houver suspeita clínica de fungos, semear também em Ágar Sabouraud glicose; incubar a temperatura ambiente durante 4 semanas.

6. INFECÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) compreende o cérebro e a medula, envolvendo ainda meninges, vasos sanguíneos, nervos cranianos e espinhais.

Principais processos infecciosos que comprometem o SNC

- Meningite aguda
- Meningite crônica
- Encefalite, mielite e neurite
- Abscesso cerebral
- Empiema subdural, abscesso epidural e flebite intracraniana supurativa
- Infecções associadas a procedimentos invasivos e dispositivos implantados no SNC

Natureza dos processos infecciosos do SNC

- Bactérias
- Vírus
- Fungos
- Protozoários

Via de acesso dos agentes infecciosos ao SNC

- Via hematogênica (principal)
- Via direta, através de trauma e procedimentos invasivos (cirúrgicos)
- Por contiguidade (rinofaringe, mediastino posterior, espaço retroperitoneal, etc.)
- Ascensão de vírus por nervos periféricos

Principais causas de meningite aguda infecciosa

- Bacteriana: bacterioscopia positiva (Gram), cultura e/ou pesquisa de antígenos positiva. *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, Enterobactérias, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *M. tuberculosis*
- Meningite por outros agentes ou não determinada
- Foco supurativo para-meningeo (abscesso cerebral, sinusite paranasal, empiema subdural, abscesso epidural, etc.)
- Espiroquetas: *T. pallidum*, *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme, *Leptospira* spp.)
- Rickettsias
- Protozoários: *Naegleria fowleri*, *Strongiloides stercoralis*
- Vírus: Echovírus e Coxsackievírus, Sarampo, Arbovírus, Herpesvírus, Coriomeningite linfocítica, HIV, Adenovírus, Poliovírus
- Fungos: *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus* spp. e outros fungos filamentosos oportunistas
- *Pneumocystis carinii* e *Paracoccidioides brasiliensis*

Causas mais frequentes de meningite infecciosa crônica

Meninges	Lesões Focais	Encefalite
tuberculose	actinomicose	citomegalovírus
cryptococose	blastomicose	enterovírus
histoplasmose	cisticercose	sarampo
candidíase	aspergilose	outras encefalites a vírus
sífilis	nocardiose	
brucelose	esquistossomose	
	toxoplasmose	

Causas mais frequentes de encefalomielite

Vírus (a mais importante)	Enterovírus e herpes-virus
Riquetsias	Doença de Lyme
Bacteriana	<i>Mycoplasma</i> spp., brucelose, listeriose e erlichiose, endocardite bacteriana subaguda, sífilis e leptospirose, tuberculose, <i>Nocardia</i> e Actinomicose
Fúngica	Criptococose, histoplasmose, <i>Pneumocystis carinii</i>
Amebas	<i>Naegleria</i> e <i>Acanthamoeba</i>
Protozoários	Toxoplasma, plasmodium, tripanosomíase
Outras	Doença de Behçet, Doença da arranhadura do gato

Principais agentes etiológicos do Abscesso Cerebral

<i>Streptococcus</i> spp. (viridans)	60-70%
<i>Bacteroides</i> spp.	20-40%
Enterobactérias	23-33%
<i>Staphylococcus aureus</i>	10-15%
Fungos	10-15%
<i>S. pneumoniae</i>	<1%
<i>H. influenzae</i>	<1%
<i>Nocardia</i> spp., <i>Listeria</i> spp.	<1%
Protozoários e helmintos	<1%

Em populações de pacientes imunocomprometidos e distribuições regionais podem evidenciar predomínio diferente dos seguintes agentes etiológicos:

- Bactérias: *M. tuberculosis* e *Nocardia* spp.
- Fungos: *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e outros fungos oportunistas
- Parasitas: estromgiloidíase, *Entamoeba histolytica*, cisticercose e toxoplasmose

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E ETIOLOGIA DE PROCESSOS INFECCIOSOS DO SNC

Idade

- 0 a 4 semanas - *E. coli*, *S. agalactiae* (grupo B), *L. monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* spp. e *Herpes simplex virus 2*
- 4-12 semanas - *S. agalactiae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *H. influenzae*
- 3 meses a 10 anos - vírus, pneumococo, *H. influenzae* e meningococo, enterovirus, herpes vírus 1.
- Adulto jovem - vírus e meningococo
- Adulto - pneumococo e meningococo
- Idosos - pneumococo, Gram negativos, *Listeria monocytogenes*.

INFECÇÃO HOSPITALAR

Enterobactérias, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp.

OUTROS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Surtos epidêmicos	Meningococo, vírus, especialmente enterovirus
Nadar em lagoas	Amebas (protozoários), <i>Aeromonas</i> spp.
Contato com hamster, ratos e animais silvestres	Coriomeningite linfocítica, <i>Pasteurella</i> spp.
Inundações	Leptospirose
Contato com pombos, cavernas	Criptococose, histoplasmose
Prisão, AIDS	Tuberculose
Meningite recorrente	Pneumococo
Infecção do trato respiratório superior	Vírus, hemófilos, pneumococo, meningococo
Associado à pneumonia comunitária	Pneumococo, hemófilos
Associado à sinusite e otite	Pneumococo, <i>Haemophilus</i> , anaeróbios
Associado à celulite	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.
Abscesso cerebral	Anaeróbios (<i>Actinomyces</i> spp. e outros), <i>Nocardia</i> spp.
Trauma craniano	Fechado - pneumococo, Gram negativos Aberto - Gram negativos, <i>Staphylococcus</i> spp.
Fístula liquórica (otorréia ou rinorréia)	Pneumococo, Gram negativos, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Haemophilus influenzae</i>
Diabetes	Pneumococo, Gram negativos, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp.
Alcoolismo e esplenectomia	Pneumococo
Endocardite bacteriana	<i>Streptococcus</i> spp. e outros Gram positivos
Petéquias e rash cutâneo	Meningococo, sarampo, echovírus, leptospirose
Prótese em SNC	<i>S. Epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> e outros gram positivos, <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., enterobactérias
Leucemia, linfoma, corticoterapia	Pneumococo, Gram negativos, <i>Cryptococcus</i> spp., <i>M. tuberculosis</i>
AIDS e imunossupressão severa (transplantes)	<i>Cryptococcus</i> spp., <i>M. tuberculosis</i> , <i>Aspergillus</i> spp. e outros fungos filamentosos, <i>Pneumocystis carinii</i>

Fatores Predisponentes e Etiologia de Abscesso Cerebral

Otite média e mastoidite	Estreptococos aeróbios e anaeróbios, <i>Bacteroides fragilis</i> , Enterobactérias
Sinusite frontoetmoidal e sinusite esfenoidal	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., Enterobactérias, <i>S. aureus</i> , <i>Haemophilus</i> spp.
Sepse dental	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
Trauma craniano penetrante infecção pós-cirúrgica	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., Enterobactérias, <i>Clostridium</i> spp.
Doença cardíaca congênita	<i>Streptococcus</i> spp., <i>H. influenzae</i>

Abscesso pulmonar, empiema e bronquiectasia

Fusobacterium spp., *Actinomyces* spp., *Bacteroides* spp., *Streptococcus* spp, *Nocardia* spp

Endocardite bacteriana

Staphylococcus aureus, *Streptococcus* spp.

Paciente imunocomprometido

Toxoplasma gondii, Fungos, Enterobactérias, *Nocardia* spp.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

DADOS LABORATORIAIS RELEVANTES

- Gram do sedimento pode revelar a etiologia: bacteriana, fúngica (fungos leveduriformes ou filamentosos), tendo uma sensibilidade de 60 a 90% e especificidade próxima de 100% quando realizada por profissionais bem treinados.
- A positividade depende da concentração bacteriana, variando de 25% quando a concentração de UFC (unidades formadoras de colônias) for 10^3 ou menos, até 97% quando a concentração for igual ou superior a 10^5 UFC.
- A positividade do Gram também varia conforme o agente etiológico, sendo de 90% para o pneumococo, 86% para o hemófilos, 75% para o meningococo, menos de 50% para *Listeria monocytogenes* e 50% para outros Gram negativos. A coloração de Gram não cora bactérias como os micoplasmas e, evidentemente, não detecta os vírus.
- Chances de se obter informações sobre a etiologia pelo Gram ou pela cultura se reduzem a menos de 50% quando há uso prévio de antimicrobianos, podendo o LCR ficar estéril em 90-100% dos casos após 24 a 36 horas de antibioticoterapia adequada.
- Tinta da china e calcofluor: detecta *Cryptococcus* ou presença de movimentos amebóides (amebas)
- Coloração de Ziehl Neelsen e auramina: micobactérias
- Aglutinação com partículas de látex (sensibilidade de 70 a 90%): existem testes disponíveis para detectar meningococo (A e C), hemófilos tipo B, pneumococo (polivalente), *Streptococcus* do grupo B, *E. coli* K1 e *Cryptococcus* spp. Alguns kits não incluem o meningococo B ou podem ter uma sensibilidade inferior para este antígeno. Existem também testes baseados em coaglutinação de *Staphylococcus*, que tem uma sensibilidade um pouco inferior à aglutinação pelo látex. Estes testes vem sendo cada vez menos utilizados pelo elevado custo.
- Teste do Limulus pode ser utilizado para detectar endotoxina de bactérias Gram negativas, tendo alta sensibilidade e especificidade para concentrações $\geq 10^3$ UFC/ml.
- Cultura em Ágar chocolate pode confirmar a etiologia bacteriana e permitir o estudo das sensibilidades aos antimicrobianos.
- Os vírus podem ser pesquisados por métodos diretos ou cultura para vírus com tipagem. A pesquisa monoclonal e o PCR representam os métodos de maior praticidade, especificidade e sensibilidade que se dispõe na atualidade.

PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS - LCR

Devido à importância vital do SNC, e, portanto, a gravidade do quadro clínico que acompanha a maioria das doenças e a urgência do diagnóstico em uma área topográfica estéril, a eficiência é um aspecto crítico (rapidez, testes adequados e cuidados para evitar contaminação). Obter qualquer amostra antes de iniciar uso de antimicrobianos.

LCR deve ter máxima prioridade devendo ser processado imediatamente. Avalie e anote o volume e o aspecto do LCR.

LCR por punção lombar ou de reservatório de próteses (vide técnica para coleta de LCR)

Coletar o segundo tubo, obtendo idealmente os seguintes volumes:

- 1-2 ml para Gram, pesquisa de antígenos e cultura (na falta de plantão de microbiologia pode ser semead a cultura [5 a 10 gotas] diretamente durante a punção para coleta do LCR, em tubos de ágar chocolate, previamente aquecidos a 35°C, preparados há menos de 30 dias); pode-se semear

um tubo com ágar sangue (base Mueller Hinton ou Ágar brucella) e um tubo com caldo tioglicolato caso haja suspeita de anaeróbios

- 2 ml para exame direto e cultura para fungos (se indicado)
- 2 ml para coloração de Ziehl e cultura para micobactérias (se indicado)
- 2-3 ml para provas virológicas (se indicado)

Exame da cultura

- Durante 72 horas observe diariamente a presença de crescimento nas placas e tubos com ágar chocolate. Pode-se prolongar a incubação para o total de sete dias.
- No tubo com caldo deve ser observada turvação diariamente e descartado após 7 dias. Caso haja crescimento, fazer um Gram e semear em placa de ágar chocolate para isolamento, identificação e antibiograma.
- Em casos de hemófilos e neisserias fazer o teste da beta-lactamase com discos de nitrocefina (Cefinase)
- Se positivo, comunicar o médico imediatamente.
- Em caso de pneumococos, testar a penicilina usando discos de oxacilina 1 micrograma. Se halo para oxacilina ≥ 20 mm, a cepa é sensível à penicilina. Halo ≤ 19 mm encaminhar a cepa a um Laboratório de Referência ou fazer teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), podendo ser usado o E-test:
 - Penicilina $\leq 0,06$ microgramos/ml = cepa sensível
 - Penicilina 0,12 a 1 microgramos/ml = cepa de sensibilidade intermediária.
 - Penicilina $\geq 2,0$ microgramos/ml = cepa resistente

Interpretação do exame

- Contagem de glóbulos brancos = $> 1.200 \text{ mm}^3$ sugere meningite bacteriana (valores menores não excluem).
- Predomínio de mononucleares ($< 50\%$ de neutrófilos) sugere meningite não bacteriana ou parcialmente tratada.
- Glicose $< 30 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ sugere meningite bacteriana, por micobactéria ou fúngica.
- Proteínas $> 150 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ sugere meningite bacteriana.
- Cloretos $< 110 \text{ mEq}/\text{L}$ sugere meningite por tuberculose se afastada outra etiologia bacteriana. Atualmente pouco utilizado devido a disponibilidade de testes mais específicos.
- Lactato no LCR $> 35 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ é sugestivo de meningite bacteriana.

PESQUISA DE ANTÍGENOS

Pode detectar a presença de microrganismos, mesmo na vigência de antibioticoterapia. Os testes detectam polissacarídes em suspensão, por isso deve-se usar o sobrenadante. Alguns testes solicitam prévia colocação da amostra para teste em banho-maria (fervente) por 5 minutos. Consulte e siga as orientações do produto adquirido.

- Colocar as gotas de látex no cartão, orientando-se conforme a indicação de cada teste.
- A seguir depositar uma gota do sobrenadante do LCR ao lado da gota de latex.
- Usar um bastão ou alça flambada para cada teste.
- Observar a aglutinação conforme padrão e no tempo descrito por cada fabricante.

Aglutinações que ocorrerem com mais de um anticorpo devem ser relatadas como indeterminadas ou não interpretável. Pode-se tentar diluir o LCR em salina 1:2 ou 1:4. Repetir os testes e observar os resultados.

Rotina de Plantão

Se não for possível encaminhar ao Laboratório de Microbiologia (plantão de fim de semana) ou porque sua rotina é lenta, o LCR deve ser processado pelo laboratório de urgência (plantão) ou por médicos ou analistas treinados para os seguintes procedimentos:

- Colher 5 a 10 gotas do LCR diretamente da punção em 1 tubo de Ágar chocolate de preparação recente e previamente aquecido a 35°C ou:

- Centrifugar 1 a 2mL do LCR entre 2.500 a 3.000 rpm, por 15 minutos.
- Cuidadosamente, flambar a boca do tubo e em condições assépticas (fluxo laminar ou atrás de um bico de Bunsen), e, para os testes de aglutinação aspirar 0,5 a 1mL do sobrenadante com ponteira estéril (ou pipeta plástica estéril ou pipeta Pasteur com ponta fina de vidro, conectada a um bulbo de borracha ou pêra de aspiração). Deixar 0,5 a 1mL para cultura e Gram. Flambar novamente.
- Agitar no vortex o tubo com o resto do sobrenadante e sedimento. Em condições assépticas (vide acima), semear 3-4 gotas do material em placa de ágar-chocolate e, se disponível, também em placa de ágar-sangue e em tubo com caldo tioglicolato sem indicador.
- Colocar as placas e tubo na estufa entre 35 a 37°C, sendo a placa de Ágar chocolate em jarra com vela e umidade (CO₂ e umidade).
- Depositar 1 gota do material no centro de uma lâmina de vidro previamente desengordurada em álcool, para fazer o esfregaço.
 - no caso de amostras límpidas, pode-se depositar duas gotas e fazer esfregaço menos extenso, quando mais purulento, fazer esfregaço mais espalhado.
 - deixar secar e fixar rapidamente no calor
 - fazer a coloração de Gram e anotar o resultado

PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS – ABCESSO CEREBRAL

Abscesso Cerebral (vide técnica para coleta de material)

- Obter o material por punção e aspiração, mantendo-o na seringa para ser enviado ao laboratório. Como a participação de anaeróbios é importante, o material deve ser colhido em frascos com vácuo ou na própria seringa.
- Manipular material de SNC com luvas, evitar aerossol e encaminhar o mais rápido possível ao laboratório. Amostras para virologia devem ser encaminhadas ao laboratório rapidamente à temperatura ambiente. As pesquisas monoclonais de vírus exigem que as células estejam íntegras. Apenas material para investigações futuras e pesquisas por métodos moleculares de agentes RNA deve ser obrigatoriamente conservado entre -20 a -70°C.

Amostras de aspirado de abscesso e de material obtido em cirurgia ou em necropsia:

- Semear em placa de ágar chocolate e incubar em jarra com vela a 35°C.
- Semear em placa com ágar brucella e suplementos hemina e vitamina K para cultura de anaeróbios em jarra apropriada com gerador de anaerobiose a 35°C.
- Semear em placa de ágar sangue em estufa a 35°C.
- Semear em tubo de caldo tioglicolato a 35°C.
- Fazer esfregaço, fixar e corar pelo Gram. Reservar o resto do material.
- Caso o Gram revele:
 - diplococos Gram negativos: sugestivo de *Neisseria* spp.
 - cocos Gram positivos em cachos agrupados: *Staphylococcus aureus* (ou coagulase neg.)
 - cocos Gram positivos em cadeias longas ou aos pares: *Streptococcus* (*S. pneumoniae* ou outros estreptococos aeróbios ou anaeróbios)
 - bacilos Gram positivos: *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp. (contaminante ou em derivações), esporulados (*Bacillus* ou *Clostridium*).
 - suspeita de bacilo da tuberculose: fazer coloração de Ziehl-Neelsen ou auramina e se confirmado, semear em Lowenstein Jensen ou outro meio específico.
 - ramificados: *Actinomyces* ou *Nocardia* (fazer Ziehl Neelsen)
 - cocobacilo Gram negativo: hemófilos, *Brucella*, *Pasteurella* sp, etc.
 - *Acinetobacter* spp. (Infecção Hospitalar (IH) em derivações e próteses do SNC)
 - bacilo Gram negativo: enterobactérias, *Pseudomonas* spp. (IH)
 - Fungos: leveduriformes ou dimórficos.
 - Candida* - exame direto com Lactofenol e semear em ágar Sabouraud dextrose (ASD)
 - Cryptococcus* spp. - tinta da china para melhor caracterização; semear em BHI ágar
 - Histoplasma capsulatum* - semear em BHI, ágar glutamina
 - Filamentosos e oportunistas em geral - semear em ASD

7. INFECÇÕES SISTÊMICAS

INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos viáveis no sangue do paciente pode levar a um considerável aumento da morbidade e da mortalidade. Devemos também lembrar que este fato representa uma das mais importantes complicações do processo infeccioso, o que torna a hemocultura um exame de significativo valor preditivo de infecção.

A maioria dos episódios sépticos é de origem hospitalar e, às vezes, resultado de microrganismos que apresentam grande resistência aos antimicrobianos, com uma mortalidade bem superior aos episódios que ocorrem na comunidade.

A invasão do sangue por microrganismos geralmente ocorre por um dos seguintes mecanismos:

1. Penetração a partir de um foco primário de infecção, através de vasos linfáticos e daí até o sangue.
2. Entrada direta na corrente sanguínea, via agulhas ou outros dispositivos vasculares, como catéteres.

A presença de bacteremia ou fungemia representa também uma falha nas defesas do hospedeiro em localizar e neutralizar uma determinada infecção em seu foco inicial, ou também numa eventual falha médica em remover ou drenar um foco infeccioso. Geralmente, num paciente imunocompetente, as defesas naturais respondem prontamente à presença de microrganismos estranhos. Esta eliminação pode ser menos eficiente quando os microrganismos são encapsulados, ou mais eficiente quando o paciente já apresenta anticorpos contra o organismo infectante. Existem também situações em que esta eliminação não é eficaz, como nos casos de infecções com focos intravasculares ou em endocardites.

Conceitualmente, ainda se classificam as bacteremias em transitória, intermitentes ou contínuas. A do tipo transitória, que em geral é rápida com duração de alguns minutos a poucas horas, é a mais comum e ocorre após uma manipulação de algum tecido infectado (abscessos e furúnculos), durante algum procedimento cirúrgico que envolve algum tecido contaminado ou colonizado (cavidade oral, cistoscopia, endoscopia) ou ocorre em algumas infecções agudas como pneumonia, meningite, artrite e osteomielite. Quando a bacteremia se manifesta, com intervalos variáveis de tempo (com o mesmo microrganismo) é denominada de intermitente. Geralmente este tipo de bacteremia ocorre em processos infecciosos relacionados a abscessos intra-abdominais, pneumonias e outras. A bacteremia contínua é característica da endocardite infecciosa e de outras infecções intravasculares.

As bacteremias na grande maioria das vezes são causadas por um único microrganismo, porém em algumas situações são de etiologia polimicrobiana.

Embora qualquer infecção localizada possa se disseminar para o sangue, a bacteremia e/ou fungemia geralmente são mais freqüentemente devidas à dispositivos intra-vasculares (catéteres), infecções abdominais, infecções dos tratos respiratório e urinário. Bacteremia e fungemia são termos que simplesmente identificam a presença de bactérias ou fungos no sangue. Sepsis é a presença de sintomas clínicos de infecção na presença ou não de hemocultura positiva.

FATORES DE RISCO PARA BACTEREMIA E FUNGEMIA

As condições que predispõem um paciente ao quadro de bacteremia ou fungemia, incluem a idade, doenças de base, medicamentos (corticóides, quimioterápicos, drogas citotóxicas) e alguns procedimentos médicos invasivos (catéteres, procedimentos endoscópicos). Há maior risco nas faixas etárias extremas e os pacientes com doenças hematológicas, portadores de neoplasias, diabetes mellitus, insuficiência renal em uso de diálise, cirrose hepática, imunodepressão e queimaduras são os mais predispostos. Alguns procedimentos cirúrgicos são também predisponentes, particularmente os do trato geniturinário e gastrointestinal.

MICRORGANISMOS FREQUENTEMENTE ENVOLVIDOS

Destacam-se as prevalências de *S. aureus* e de *E. coli*, sendo que na última década nota-se um significativo aumento na incidência de casos devidos a estafilococos coagulase negativos, o que pode causar dificuldade na interpretação dos resultados microbiológicos, pois cerca de 85% destes isolamentos podem representar contaminação ao invés de uma bacteremia verdadeira.

Entre os agentes que na última década se tornaram prevalentes, destacam-se os enterococos, os fungos e as micobactérias relacionadas aos pacientes portadores do HIV. As bacteremias causadas por bactérias anaeróbias são muito raras. Em crianças, o perfil de microrganismos assemelha-se ao da população adulta (os microrganismos são similares aos que ocorrem na população adulta), mas há uma maior prevalência de bacteremias por estafilococos, e , principalmente, por *S. pneumoniae*, meningococos e hemófilos.

A identificação do microrganismo isolado fornece um valor preditivo importante.

- Alguns microrganismos em cerca de 90% dos casos sugerem uma infecção verdadeira como *S. aureus*, *E. coli* e outras enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumoniae* e *Candida albicans*.
- Outros agentes como *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. e *Propionibacterium acnes*, raramente representam uma verdadeira bacteremia (menos de 5% dos casos são verdadeiros).
- Os *S. viridans*, Enterococos e *Staphylococcus* coagulase negativos representam em média respectivamente 38%, 78% e 15% de bacteremias verdadeiras.
- Considera-se aceitável um percentual entre 3 a 5% de hemoculturas contaminadas.

Patógenos raros relacionados à imunossupressão causada por câncer ou leucemia

- *Aeromonas hydrophila*
- *Bacillus* spp.
- *Campylobacter* spp.
- *Capnocytophaga* spp.
- *C. septicum*
- *Corynebacterium jeikeium*
- *L. monocytogenes*
- *Mycobacterium fortuitum/chelonei*
- *Rhodococcus equii*
- *S. typhimurium*
- *Streptococcus* do grupo G
- *Streptococcus bovis*

DIAGNÓSTICO EM HEMOCULTURAS

NÚMERO DE AMOSTRAS

Recomenda-se colher duas a três amostras por episódio de bacteremia ou sepse, que permite o isolamento do agente bacteriano ou fúngico em 95% dos eventos. Duas ou três amostras também representam volume de sangue adequado para o isolamento, também permitem interpretar pelo número de amostras positivas o provável contaminante do isolamento do agente etiológico. Um número maior de amostras traz pouco benefício, aumentando o custo, trabalho e depletando o paciente.

PROCEDIMENTOS E INTERVALO DE COLETA

As amostras são coletadas por punção venosa, uma após a outra em locais diferentes, logo que inicie o pico febril ou a bacteremia. Preferencialmente não colher de cateter, exceto para diagnóstico de infecção ou colonização do cateter; colher uma a duas amostras periféricas e uma de cateter. Para adultos em cada punção coleta-se 8 a 10 ml de sangue em frascos para aeróbios ou opcionalmente a segunda ou terceira coleta em frasco para anaeróbios.

VOLUME DE SANGUE

É uma das variáveis mais críticas para a positividade do exame. Quanto maior o volume coletado, maior será a positividade do mesmo. Temos que respeitar a idade do paciente (adulto ou criança) e o volume recomendado de acordo com os tipos de frascos aeróbios e anaeróbios utilizados na realização dos exames.

O volume recomendado para coleta de cada punção de adulto é de 20 a 30 ml, distribuídos pelo número de frascos indicados pela sua capacidade e respeitando a proporção de 1 ml de sangue para cada 10 ml ou no mínimo 5 ml de caldo.

Como as bacteremias em crianças tem cerca de 100 a 1000 bactérias/ml em comparação com < 1 a 10 bactérias/ml nos adultos, o volume pode ser menor (3 a 5ml), respeitando-se também a proporção de no mínimo 1:5 até 1:10 de sangue e meio de cultura ou orientação do fabricante.

PROCEDIMENTOS POR METODOLOGIAS MANUAIS

- Embora amplamente utilizada por razões de custos, não é a metodologia mais indicada, por ser mais trabalhosa, além de favorecer a possibilidade de contaminação das amostras examinadas.
- Além do frasco contendo caldo BHI ou peptona de soja, o meio manual mais interessante inclui uma fase líquida e outra sólida, como o meio de Castañeda, permitindo a observação de crescimento na superfície do ágar.
- Um mínimo de sete dias de incubação e agitação moderada dos frascos são fatores importantes para uma maior positividade das amostras; pelo menos três subcultivos enriquecidos em ágar chocolate devem ser realizados durante este prazo. Tanto os frascos de hemocultura como os subcultivos, devem ser mantidos à temperatura de 36 a 37°C.
- O primeiro subcultivo pode ser feito após 24 horas de incubação, o segundo após 72 horas e o terceiro após uma semana.
- A grande maioria dos microrganismos é isolada nas primeiras 72 horas após a coleta do sangue. Em suspeitas diagnósticas de microrganismos de crescimento mais lento, períodos mais prolongados de incubação devem ser indicados. Comumente incuba-se à temperatura entre 35 a 37°C.
- A observação dos frascos pode ser feita diariamente, procurando-se evidências macroscópicas de crescimento de microrganismos como: hemólise, turbidez, produção de gás, bolhas, película de crescimento, grumos, etc.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE HEMOCULTURA

No intuito de se processar as hemoculturas de um modo mais eficiente, nos últimos anos alguns sistemas automatizados para a execução destes exames foram desenvolvidos.

O primeiro sistema comercial automatizado foi o Bactec modelo 460, que usa metodologia radiométrica (Becton Dickinson Microbiology Systems). Esta metodologia detectava o crescimento microbiano através da monitorização da concentração de CO₂ marcado com carbono 14 presente no frasco, medindo a liberação na atmosfera dos frascos devido ao metabolismo microbiano. O aparelho registrava um valor através da sua medição por um contador de radiação beta e anotava esse valor por um número conhecido como índice de crescimento. Atualmente essa metodologia está em uso praticamente somente para a detecção de micobactérias e também para realização de testes de avaliação de sensibilidade aos tuberculostáticos.

Atualmente existem no mercado diversos outros aparelhos automatizados para a realização de hemoculturas que apresentam grande vantagem em relação às metodologias manuais, principalmente no que se refere à rapidez dos resultados e diminuição do trabalho técnico. Geralmente os protocolos são de cinco dias, mas a grande maioria dos resultados positivos ocorre nas primeiras 48 horas. As metodologias utilizadas pelos novos aparelhos automatizados (Bactec 9120/9240, BacT/Alert 120/240, ESP 128/256/384 e Vital 200/300/400) são baseadas em métodos colorimétricos, fluorescentes ou de pressão.

Sistema Isolator ou lise centrifugação (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) é um tubo especial que contém saponina como agente lisante para células brancas e vermelhas, propilenoglicol com substância anti-espuma, polianetol sulfonato de sódio (SPS) e EDTA como anticoagulantes, e um líquido fluoroquímico inerte para concentrar os microrganismos durante a centrifugação. Para realização da técnica é necessária uma observação criteriosa dos procedimentos técnicos recomendados pelo fabricante, utilizando para isso os reagentes, o material e o equipamento apropriado (incluindo centrífuga especial). Indicado para cultivo de fungos dimórficos, leveduras e outras bactérias incluindo fastidiosas.

Inúmeros trabalhos mostram as vantagens destas metodologias e a opção da escolha do equipamento em geral é mais relacionada ao custo do equipamento e/ou de seus frascos de consumo. Algumas vantagens dessa metodologia são:

- Maior rapidez para positividade da amostra (agitação)
- Continuo monitoramento da amostra pelos sistemas totalmente automatizados
- Menor risco de contaminação laboratorial, pois só faz-se repique das amostras positivas

- Não é necessário repicar amostra negativa
- Economia de tempo, material (agulha e seringa) e menor risco de manipulação.

A principal desvantagem é o maior custo.

MEIOS DE CULTURA

Atualmente os laboratórios que ainda utilizam metodologias manuais, em sua grande maioria utilizam meios de cultura comerciais, aeróbios e anaeróbios, para a realização de hemoculturas. Trata-se geralmente de caldo infusão cerebro-coração (BHI) ou caldo caseína digerida da soja, para aeróbios e facultativos e leveduras e caldo Columbia para anaeróbios que devem favorecer o crescimento da maioria dos microrganismos, inclusive dos considerados fastidiosos.

A maioria destes meios tem na sua composição o anticoagulante SPS (0,025 a 0,05%), o qual apresenta ação inibidora para lisozimas, apresenta certa ação inibitória frente a determinadas concentrações de aminoglicosídeos e polimixinas, pode ter ação inibitória para algumas frações do complemento e inibe parcialmente a fagocitose. Por outro lado este anticoagulante pode apresentar certa ação inibidora para o isolamento de determinados microrganismos, como por exemplo, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Peptostreptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis* e outros. Daí a recomendação de se acrescentar gelatina na concentração de 1,2% na composição destes meios para inibir parcialmente o efeito nocivo do SPS quando há suspeita de um dos agentes acima citados.

Para os laboratórios que dispõem de metodologias automatizadas, há possibilidade do uso de meios de cultura com resinas que apresentam ação inibitória para antimicrobianos, útil pacientes que receberam antibioticoterapia prévia.

Os frascos aeróbios devem manter área suficiente de volume de ar para permitir crescimento de bactérias aeróbias estritas como *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras, enquanto os frascos para anaeróbios estritos devem ter uma mistura de gases livres de oxigênio, evitando-se a introdução de ar durante a coleta. Agitação do meio é um fator importante para facilitar a multiplicação bacteriana, principalmente dos aeróbios estritos e facultativos.

Não há evidências que indiquem o uso rotineiro de frascos de hemocultura para anaeróbios, associados aos frascos para aeróbios, exceto se este for o objetivo principal ou em patologias freqüentemente associadas aos anaeróbios como processos infecciosos pélvicos, sepse de origem abdominal, etc. Em geral os meios para aeróbios suportam o crescimento dos anaeróbios mais comuns e a incubação não necessita ser superior a 7 dias.

Para fungos filamentosos a temperatura melhor é entre 27 a 30°C, podendo crescer também à 37°C. Para leveduras 5 a 7 dias à 35°C pode ser suficiente, enquanto que para fungos dimórficos (*Histoplasma*, *Paracoccidioides*) pode ser necessário 4 a 6 semanas, sendo o caldo BHI o melhor. Pacientes com infecção avançada pelo HIV tem risco elevado de infecções por *M. tuberculosis* e pelo complexo *Mycobacterium avium*, podendo também apresentar bacteremia, bem como outros imunossuprimidos. A inoculação do sangue concentrado pode ser feita em Ágar Lowenstein-Jensen ou Middlebrook 7H11 ou usar os frascos específicos para *Mycobacterium* de sistemas automatizados como Bactec. A concentração pode ser feita pelo sistema Isolator (lise-centrifugação).

INFECÇÃO RELACIONADA A CATETER VASCULAR

Cateteres intravenosos são importantes fontes de bacteremia e fungemia, assim como complicações infecciosas no local da inserção. Quando existe suspeita de infecção relacionada ao cateter, as secreções do local de inserção e a ponta do cateter podem ser cultivadas.

CULTURA SEMI-QUANTITATIVA DA SUPERFÍCIE DO CATETER (MÉTODO DE MAKI)

É o método mais utilizado para determinar a relação entre colonização do cateter e infecção. Os mesmos cuidados de inserção devem ser adotados na retirada do cateter. A pele em volta deve ser cuidadosamente desinfetada com solução de iodo ou PVPI, e o excesso removido com álcool a 70%. Um segmento distal (que estava inserido na veia do paciente), de aproximadamente 5 cm do cateter é assepticamente cortado com auxílio de tesoura estéril, colocado em um frasco estéril seco, e remetido em um prazo mínimo ao laboratório. O segmento do cateter é rolado (evitar esfregar) 4 a 5 vezes sobre a superfície de uma placa de ágar sangue, com auxílio de uma pinça estéril. Após incubação

durante 18-24 horas à 37°C, é realizada uma análise quantitativa e a detecção de 15 ou mais colônias é correlacionada com o fato do cateter constituir a fonte de infecção. Técnicas quantitativas pareadas ou não com hemocultura periférica são mais específicas que as técnicas semi-quantitativas.

TÉCNICAS QUANTITATIVAS

Segmento de cateter (lumen e/ou superfície externa)

- Cultura do lumen: o lumen do cateter pode ser cultivado injetando-se salina no seu interior com uma agulha.
- Cultura da superfície externa: agita-se no mixer o segmento do cateter em salina. Faz-se cultura quantitativa (semeia-se 100 µl do lavado em Ágar sangue). É considerado significativo quando a contagem for $\geq 10^2$ UFC pelo segmento de cateter analisado.

AMOSTRAS PAREADAS DE SANGUE

Para diagnóstico de infecção relacionada a cateter (IRC), colher amostras pareadas: periférica e cateter. Utilizam-se volumes iguais de sangue colhido das duas vias e semeia-se pela técnica do pour plate. O exame quantitativo significativo para infecção do cateter deve revelar de 5 a 10x mais bactérias por ml no sangue obtido do cateter do que na amostra periférica.

8. INFECÇÕES GENITAIS

INTRODUÇÃO

Os microrganismos que colonizam o trato genital feminino incluem lactobacilos, difteróides, *Gardnerella vaginalis*, estafilococos coagulase negativos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus* spp., estreptococos alfa e gama hemolíticos, *Escherichia coli* e leveduras.

A uretra masculina normalmente contém relativamente poucos microrganismos encontrados na pele, tais como: estafilococos, micrococos, corynebactérias e estreptococos alfa hemolíticos.

Muitas infecções do trato genital feminino têm origem em microrganismos endógenos. A patogenicidade deles pode ser facilitada por fatores do hospedeiro, como por infecções primárias causadas por outros microrganismos como: *herpes simplex* vírus (HSV), o vírus papiloma humano (HPV), *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, ou ainda com infecções específicas como aquelas causadas pela *Neisseria gonorrhoeae*.

O Laboratório de Microbiologia deve estar capacitado para detectar os principais agentes das doenças sexualmente transmissíveis: *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*.

PRINCIPAIS SÍNDROMES INFECCIOSAS DO TRATO GENITAL

Vaginite Infeciosa	candidíase vulvo-vaginal · tricomoníase
Vaginose bacteriana (polimicrobiana)	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Mobiluncus</i> spp <i>Mycoplasma hominis</i> Anaeróbios (<i>Bacteroides</i> não fragilis, <i>Peptococcus</i> spp)
Vulvo-vaginites em crianças	Enterobacteriaceae <i>Streptococcus pyogenes</i> outros beta-hemolíticos
Vaginite não-infeciosa	irritantes químicos ou outros; alergia, hipersensibilidade e dermatite de contato; vaginite traumática; vaginite atrófica; vaginite atrófica pós-puerperal; doença vascular do colágeno; vaginite idiopática

Menos comuns:

- vaginite atrófica com infecção bacteriana secundária
- corpo estranho com infecção secundária
- vaginite inflamatória descamativa
- vaginite ulcerativa associada com *S. aureus* (síndrome do choque tóxico)

CANDIDÍASE VULVO-VAGINAL

Os dados epidemiológicos da vulvovaginite por *Cândida* são incompletos. A candidíase vulvovaginal é rara em mulheres antes da menarca. Em mulheres até os 25 anos, pelo menos um episódio de candidíase é freqüentemente encontrado. Nas mulheres na pré-menopausa, em pelo menos 75% delas, observa-se um episódio de candidíase vulvovaginal. Nas mulheres pós-menopausa, a incidência é mais rara. Parece que o mecanismo imune local da vagina é responsável pela freqüência dos episódios e a susceptibilidade é associada a uma condição de mucosa não-secretora, o que facilitaria a implantação da levedura.

A candidíase vulvovaginal não é tradicionalmente considerada como doença sexualmente transmitida, pois ocorre em mulheres celibatárias e a *Candida* spp. também faz parte da microbiota vaginal normal. Episódio individual de candidíase vulvovaginal parece não estar relacionado à faixa etária nem ao número de parceiros ou freqüência de relações sexuais.

A candidíase vulvovaginal recorrente é definida como quatro ou mais episódios da infecção por ano e ocorre em menos de 5% de mulheres saudáveis. Entretanto ela é importante em pacientes diabéticas não controladas e nas que fazem uso de drogas imunossupressoras.

A *Candida albicans* é a responsável por 80-92% dos episódios de candidíase vulvo-vaginal. Mais recentemente outras espécies como *Candida (Torulopsis) glabrata* e *Candida krusei* também foram consideradas patogênicas.

FATORES PREDISPONENTES

Incluem gravidez, diabetes, antimicrobianos de amplo espectro e contraceptivo oral com altas taxas de estrogênios.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial é facilmente realizado no laboratório de microbiologia, a partir do conteúdo vaginal ou secreção uretral. Podem ser utilizados os seguintes métodos:

- Exame direto a fresco e/ou após coloração pelo método de Gram.
- Exame colpocitológico pelo Papanicolaou.
- Isolamento em meios de cultura comuns (Ágar Sangue, Ágar Sabouraud).
- Identificação das leveduras por métodos automatizados ou através de provas clássicas como: auxonograma, zimograma e pesquisa de tubo germinativo.
- Antifungigrama com drogas específicas: miconazol, fluconazol, ketoconazol, itraconazol, clotrimazol e nistatina.
- Pesquisa de *Candida albicans* por metodologia de sondas de DNA.

TRICOMONÍASE

A *Trichomonas vaginalis* afeta aproximadamente 180 milhões de mulheres em todo o mundo. Em muitos países industrializados a prevalência da tricomoníase tem diminuído. A *Trichomonas vaginalis* é identificada em 30-40% dos homens, parceiros sexuais de mulheres infectadas. Ela também está associada com outras doenças sexualmente transmitidas. Na mulher, a tricomoníase varia de portadora assintomática até doença aguda inflamatória. Em mulheres grávidas, sem tratamento, está associada com ruptura de membranas, nascimento prematuro e celulite pós-histerectomia.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da tricomoníase pode ser realizado através de exames diretos, cultura ou técnicas moleculares. O pH vaginal está marcadamente elevado e há aumento do número de leucócitos polimorfonucleares. A visualização de *Trichomonas* móveis pelo exame direto a fresco é positiva em cerca de 50-70% dos casos confirmados em cultura. Embora os *Trichomonas* possam ser visualizadas através de esfregaços pelo Papanicolaou, a sensibilidade é de apenas 60-70%. Microbiologistas experientes visualizam facilmente estas estruturas pelo método de Gram que detecta também as formas imóveis.

As técnicas de cultura possuem alta sensibilidade (95%) e devem ser realizadas quando os exames diretos são negativos e o pH está aumentado na presença de numerosos leucócitos polimorfonucleares.

Um diagnóstico rápido pode ser realizado através de "Kits" usando sondas de DNA e anticorpos monoclonais com sensibilidade de 90% e especificidade de 99,8%. Os testes mais freqüentemente utilizados são:

- Exame direto a fresco e/ou após coloração pelo Gram
- Exame colpocitológico pelo Papanicolaou
- Isolamento em meios de cultura específicos (Roiron, Kupferberg, Diamond)
- Pesquisa pela metodologia de sondas de DNA

VAGINOSE BACTERIANA

É a mais frequente causa de vaginite em mulheres sexualmente ativas. Além da *Gardnerella vaginalis* outras bactérias estão envolvidas, tais como: *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp. e *Mycoplasma hominis*.

Vários estudos têm demonstrado um aumento de 2 a 7% na taxa de risco de nascimentos prematuros em mulheres com vaginose bacteriana. A vaginose bacteriana representa uma mudança complexa na microbiota vaginal, caracterizada pela redução na prevalência e concentração de lactobacilos produtores de peróxido de hidrogênio e um aumento na prevalência e concentração de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis*, bacilos Gram negativos anaeróbios principalmente dos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Bacteroides*.

A transmissibilidade da vaginose bacteriana foi demonstrada por Gardner e Dukes (1955) e a doença pode ser considerada uma DST. A transmissão não é suficiente para explicar todos os casos, pois o microrganismo é encontrado normalmente em algumas mulheres sadias e também em jovens sem atividade sexual. Os fatores de risco para vaginose bacteriana incluem o uso de dispositivo intrauterino e gravidez.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os critérios para se estabelecer o diagnóstico de vaginose bacteriana são simples e podem ser usados na clínica e no Laboratório com bastante sucesso. A presença de "clue cells", células escamosas do epitélio vaginal cobertas com bactérias de modo que os bordos da célula perdem a definição, é o achado de melhor valor preditivo de vaginose bacteriana. O exame pelo Gram de secreção vaginal é o método de escolha para visualização de "clue cells" com sensibilidade de 93% e especificidade de 70%.

A cultura para *G. vaginalis* é positiva em todos os casos de vaginose bacteriana, e pode ser detectada em 50-60% de mulheres sadias assintomáticas. Desta maneira a cultura vaginal, isoladamente, não deve fazer parte do diagnóstico de vaginose bacteriana. O uso de metodologia de sondas de DNA, possui sensibilidade e especificidade semelhantes à cultura, mas o seu custo é muito elevado.

No diagnóstico laboratorial os seguintes testes são freqüentemente utilizados:

- pH vaginal > 4,5; odor desagradável após a adição de KOH 10% à secreção
- Bacterioscópico pelo Gram: ausência ou diminuição de leucócitos e de lactobacilo, presença de "clue-cells", grande quantidade de bacilos Gram-variáveis (lábeis)
- Cultura: isolamento em meio seletivo (ágar vaginalis)
- Pesquisa pelo uso de metodologia de sondas de DNA

Incidência relativa de vaginite/vaginose em mulheres com sintomas

	Vaginose bacteriana	Candidíase	Trichomoníase
Incidência relativa	35% a 50%	20% a 25%	5% a 15%
Fatores demográficos	População dependente: - 20%: clínicas de planejamento familiar. - 35%: clínicas de DST - 10-30%: em mulheres grávidas	Fatores de risco: diabetes, gravidez, contraceptivo oral, baixa imunidade.	Transmitida sexualmente, alta incidência com outras DST.

Incidência de co-infecção nas vaginites/vaginoses

Tipos de vaginites	Patógenos Associados	Incidência de co-infecção
Vaginose bacteriana	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteróides</i> spp., <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mobiluncus</i> spp.	- 5 a 10% com leveduras - > 15 % com <i>Trichomonas</i> também com <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

Candidíase	<i>Candida</i> spp.	- 15 a 25% com vaginose bacteriana - > 15% com <i>Trichomonas</i>
Tricomoniase	<i>Trichomonas vaginalis</i>	- > 10% com vaginose bacteriana - > 15% com leveduras também com <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

INFECÇÃO GONOCÓCICA

A gonorréia é uma doença antiga e o agente, *Neisseria gonorrhoeae*, foi descrito por Neisser em 1879. Apesar de ser uma doença bem documentada de longa data, continua sendo de difícil controle. O sucesso e a persistência histórica do gonococo como patógeno amplamente distribuído se deve ao fato de que o homem é o único hospedeiro natural e a forma de transmissão mais comum é a via sexual.

A doença envolve primariamente o trato genito-urinário podendo ocorrer várias complicações, entre as quais, endocardite, meningite, artrite e pielonefrite. A orofaringe do reto e a conjuntiva podem também ser primariamente infectadas. As infecções causadas por *Neisseria gonorrhoeae* na mulher incluem uretrite, cervicite, podendo invadir as glândulas de Bartholin e de Skene. A partir destas estruturas, a infecção pode disseminar-se para o endométrio, trompas ovarianas, ovários, superfície peritoneal e estruturas contíguas, causando a Doença Inflamatória Pélvica (DIP). Muitos casos de DIP estão primariamente associados com outros patógenos, como *Chlamydia trachomatis* e uma gama variada de bactérias anaeróbias e facultativas. A oftalmia neonatorum ocorre em recém-nascidos, de mães portadoras, havendo contaminação no canal do parto. A infecção no homem se apresenta usualmente sob a forma de uretrite aguda. Entre os sintomas precoces estão: a sensação de desconforto e dor uretral.

A resposta inflamatória inicial é um corrimento mucóide, seguido por um exudato purulento que aparece 2 a 5 dias após a relação suspeita. A infecção pode progredir da uretra anterior para a uretra posterior em 10 a 14 dias. Os sintomas incluem aumento da disúria, poliúria e ocasionalmente febre e dor de cabeça. As glândulas, dutos e vesículas do trato genito-urinário podem tornar-se sítios de complicações locais. Infecção crônica da próstata, vesícula seminal e epidídimo, bem como estreitamento uretral, podem ocorrer. Dentre os fatores que contribuem para o aumento da incidência da gonorréia estão: a bactéria, o hospedeiro e as características clínicas da doença.

FATORES QUE ENVOLVEM A BACTÉRIA

- Resistência aos antibióticos e variação antigênica. O aparecimento de cepas de gonococo pouco sensíveis aos antibióticos tem causado muito interesse nos últimos anos, no campo das doenças sexualmente transmissíveis (dst) e tem sido objeto de extensas investigações em muitas regiões do mundo.
- Reinfecção, o que sugere que a infecção não proporciona uma resposta protetora do hospedeiro. Indivíduos infectados produzem resposta adequada com anticorpos anti-*N. gonorrhoeae*, sendo esta resposta o IgA contra as proteínas da superfície bacteriana. Por que então estas pessoas não se tornam imunes a reinfecção? A razão principal é que *N. gonorrhoeae* varia seus antígenos de superfície, especialmente os antígenos dos "pili" de modo que a resposta IgA original se torna rapidamente obsoleta. No caso dos "pili", a bactéria possui um repertório antigênico que pode chegar a 1 milhão de variações antigênicas.

FATORES QUE ENVOLVEM O HOSPEDEIRO

- Aumento da promiscuidade - o risco individual de contrair a gonorréia depende não somente da frequência de exposição sexual, mas também da prevalência da doença na população de onde são tomados os parceiros sexuais. Assim, indivíduos com grande número de diferentes parceiros sexuais possuem um maior risco de contrair gonorréia. Alguns trabalhos demonstram o encontro de gonorréia e sífilis 20 vezes mais freqüente em homens com mais de 4 parceiras sexuais do que em homens com única parceira sexual.
- Uso de contraceptivos - o uso correto do preservativo de borracha é eficaz na profilaxia da gonorréia genital. O uso de contraceptivos orais, entretanto, aumentam entre os seus usuários o risco de contrair a gonorréia seja pelo aumento do número de parceiros como pela maior frequência de relação sexual.

- Aumento de mobilidade populacional - altas taxas de deslocamentos geográficos e sociais acompanhados de solidão e privação de direitos aumentam a frequência de relações sexuais e leva a altas taxas de revalência da gonorréia nessas populações.
- Homossexualidade - a gonorréia é altamente prevalente entre os homossexuais. Em centros urbanos os homossexuais masculinos contribuem de forma acentuada para a propagação da gonorréia.
- Recidivas - pacientes com infecções gonocócicas repetidas contribuem de forma intensa para o aumento da incidência de gonorréia. Assim, pacientes que continuam a ter relação sexual sob as mesmas condições e com o mesmo tipo de população, possuem alto risco de contrair uma segunda infecção. A recidiva é um problema significativo em pacientes jovens.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DOENÇA

A doença envolve primariamente o trato gênito-urinário podendo, entretanto, desenvolver várias complicações entre as quais, endocardite, meningite, artrite e pielonefrite. O gonococo invade as células do hospedeiro por um processo semelhante ao da fagocitose. Os sinais clínicos de infecção são aparentemente devidos a migração de leucócitos e ativação do complemento no sítio da infecção.

A persistência do gonococo no hospedeiro é provavelmente causada pela sua fagocitose por células epiteliais, um processo que o protege então da atividade fagocítica dos leucócitos. O gonococo produz também uma IgA protease que inativa a IgA secretora.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O gonococo é uma bactéria frágil. As amostras clínicas submetidas a cultura devem ser semeadas imediatamente, pois a bactéria se auto-lisa com muita facilidade e é sensível a variações de temperatura. As amostras devem ser obtidas sempre antes do início do uso de antimicrobianos.

Quando é necessário transportar a amostra até o laboratório, medidas adequadas devem ser tomadas, como o uso de meios de transporte adequados ao gonococo. Para amostras obtidas de articulações, a cultura deve ser realizada em meio hipertônico contendo 20% de sacarose ou 20% de soro de cavalo, pois nestas amostras, o gonococo se encontra na forma L, desprovida de parede celular e não cresce nos meios habituais. A não observância dessas recomendações implica na obtenção de culturas negativas.

Os seguintes exames podem ser utilizados:

- Exame direto pelo método de Gram: esfregaços de amostras genitais femininas são muito menos confiáveis para fins diagnósticos do que as do sexo masculino. A sensibilidade do método de Gram neste caso é de apenas 50%, quando comparado à cultura.
- Detecção de antígenos por enzima-imunoensaio.
- Isolamento em meios de cultura específicos (Thayer-Martin ou similar).
- Identificação das colônias através de provas bioquímicas manuais ou automatizadas, imunofluorescência direta ou co-aglutinação.
- Técnicas moleculares como pesquisa pela metodologia de sondas de DNA ou por técnicas de amplificação (PCR).
- Pesquisa de beta-lactamase.

Diagnóstico Laboratorial das Infecções por *N. gonorrhoeae*

Paciente	Local das amostras		Exames
	Primários	Secundários	
Feminino	Endocérvice	reto, uretra, faringe	Gram, Cultura e/ou técnicas moleculares
Masculino heterossexual	Uretra		Gram
Masculino homossexual	uretra, reto, faringe		Gram, Cultura e/ou técnicas moleculares
DIP feminino	sangue, endocérvice, reto	faringe ^a , lesão pele ^b , fluido de articulação ^b , uretra	Cultura e/ou técnicas moleculares
DIP masculino	sangue, uretra	faringe ^a , lesão pele ^b , fluido de articulação ^b , reto ^c	Cultura e/ou técnicas moleculares

^a - se possuir história de contato orogenital; ^b - se presente; ^c - se possuir história de contato anogenital

INFECÇÕES POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS

As clamídias são bactérias parasitas intracelulares obrigatórias, patógenos importantes amplamente distribuídos através do reino animal. Somente poucas espécies são patogênicas para o homem. A *Chlamydia psittaci* causa psitacose, a *Chlamydia trachomatis* causa infecção ocular, respiratória e no trato genital e a *Chlamydia pneumoniae* causa pneumonia atípica.

Síndromes humanas por *Chlamydia trachomatis*

Sorotipos	Sexo	Síndrome
A, B, Ba, C	ambos	tracoma, conjuntivite, queratite
	mulher	uretrite não gonocócica, cervicite, endometrite, salpingite, peri-hepatite
D, E, F, G, H, I, J, K	homem	uretrite não gonocócica, prostatite, epididimite
	ambos	conjuntivite, proctite, síndrome de Reiter
	recém-nascidos	oftalmia neonatorum, pneumonia
L1, L2, L3	ambos	linfogranuloma venéreo

A *Chlamydia* é, do ponto de vista metabólico, incapaz de produzir sua própria energia e, desta maneira, retira ATP da célula hospedeira, sendo denominada de parasita energética. A *Chlamydia trachomatis* infecta somente o homem e é usualmente transmitida por contato pessoal, isto é, sexualmente ou através do canal do parto. No tracoma, a bactéria é transmitida por contato dos olhos com os dedos ou com fômites contaminados.

A infecção por clamídia tornou-se altamente prevalente, mas devido sua natureza mais branda, ela não tem sido reconhecida e, muitas vezes, permanece sem tratamento. Os estudos epidemiológicos de infecção por clamídia têm documentado uma prevalência substancial do microrganismo em adultos jovens e ativos sexualmente. Estes estudos relatam taxas de prevalência na faixa de 5% a 20% entre mulheres que freqüentam clínicas de planejamento familiar; freqüências mais altas de 20-40% foram notadas entre mulheres e jovens adolescentes sexualmente ativas que freqüentavam clínicas de DST e em cerca de 25% de todas as mulheres atendidas em clínicas ginecológicas.

Aproximadamente 8% de todas as mulheres jovens atendidas em maternidades, sem sintomas de infecção urogenital, são portadoras de *C. trachomatis*. Da mesma maneira, pelo menos 3% dos homens atendidos em clínicas de DST, sem sintomas genito-urinários, são portadores de *C. trachomatis*. Aproximadamente 50% das uretrites não gonocócicas (UNG) são causadas por esse agente.

As infecções por clamídia coexistem freqüentemente com a gonorréia. Nos Estados Unidos e regiões da Europa, 35-50% das mulheres com gonorréia apresentam infecção simultânea por clamídia; além disto, os estudos mostram também que 20-25% dos homens heterossexuais com gonorréia estão infectados também por *C. trachomatis*.

A uretrite é a manifestação mais comum da infecção por clamídia, no homem. Ela é duas vezes mais freqüente que a gonorréia em algumas populações e sua incidência tem aumentado. *C. trachomatis* virtualmente é responsável por todas as complicações da uretrite não gonocócica.

Na mulher as infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* incluem cervicite mucopurulenta, síndrome uretral, endometrite e salpingite. As infecções do trato genital superior causam esterilidade ou predisõem à gravidez ectópica. As complicações na mulher são as mais graves de todas que ocorrem com doenças por clamídias. Além disso, na mulher, o risco é duplo, para ela e para seu recém-nascido.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Tanto *Chlamydia* como gonococo, graças às recentes utilizações dos testes moleculares, apresentam atualmente uma alta possibilidade de diagnóstico. Anteriormente, o teste mais confiável capaz de

identificar Chlamydia era o isolamento em cultura de células, que tem sensibilidade no máximo de 80-90%. Embora as culturas sirvam como “padrão ouro”, elas são tecnicamente complicadas e demoradas.

O transporte de amostras laboratoriais para cultura requer meios especiais e temperaturas específicas de estocagem. Por outro lado, as amostras para testes moleculares podem ser coletadas em água ou salina estéreis e transportadas à temperatura ambiente ou congeladas. Os testes moleculares para diagnóstico de *C. trachomatis* produzem resultados rápidos, confiáveis e custo com tendência a cair, atualmente já se encontrando próximo ao da cultura. A amostra adequada deve ser coletada da forma tradicional com swab ou escova endocervical. O exame pode ser realizado à partir de urina de primeiro jato o que pode reduzir sua sensibilidade no diagnóstico da cervicite, endometrite e salpingite.

Os testes moleculares são mais complexos e mais caros que do que outros anteriormente utilizados, mas produzem resultados rápidos (horas ao invés de dias) e, pela primeira vez, espécimes podem ser coletados sem a introdução de swabs ou escovas no canal endocervical ou na uretra, pois sua sensibilidade permite também encontrar traços do microrganismo em amostras de urina.

Os exames para o diagnóstico de Chlamydia incluem:

- Exame direto, de raspado de mucosa cervical, pelo método da Imunofluorescência Direta ou por técnica Imunoenzimática.
- Isolamento em cultura de células MacCoy e identificação por técnica de Imunofluorescência.
- Pesquisa por metodologia molecular: Hibridização ou captura híbrida; PCR com detecção por hibridização; Testes sorológicos. RFC, IF-IgG, IF-IgM.

Testes laboratoriais no diagnóstico das infecções genitais por *Chlamydia*

Cultura	Citologia			Sorologia			Téc. Moleculares	
	Giemsa	IFD	EIA	RFC	IF-IgG	IF-IgM	PCR	Sondas DNA
Positiva: material de raspado de mucosas	Não recomendada	Positiva	Positiva	Negativa ou positiva título baixo ¹	Positivos pareados	Eventualmente positiva ²	Positiva	Positiva

¹- consideram-se títulos baixos até 1:16 e títulos altos de 1:32 ou mais. Maior valor diagnóstico que títulos altos é a elevação de 4x o título entre amostras de soro no início da doença e 2 semanas após.

²- positiva nas primeiras semanas da infecção.

IFD: imunofluorescência direta

EIA: método imuno-enzimático

RFC: reação de fixação do complemento

INFECÇÕES POR *MYCOPLASMA SPP.*

Alguns micoplasmas são habitantes normais do trato genito-urinário, sobretudo em mulheres. Em ambos os sexos, a presença de micoplasma no trato genital está diretamente relacionada com o número de parceiros sexuais.

O *M. hominis* pode ser isolado de 30-70% das mulheres assintomáticas, enquanto o *U. realyticum* é encontrado no trato genital de 40-80% das mulheres sexualmente ativas. Além disso, outras espécies de micoplasmas podem ocorrer no trato genital inferior, tais como: *M. fermentans* e *M. genitalium* com pequeno significado clínico.

O *M. hominis* está fortemente associado à infecção das trompas ovarianas e a abscessos tubo-ovarianos. Ele pode ser isolado através de hemoculturas em cerca de 10% das mulheres com febre puerperal e no líquido sinovial de pacientes com artrite.

O *U. urealyticum* é comum no trato genital feminino, porém a sua associação com doença é discutível. Ele tem sido associado à ocorrência de doenças pulmonares em prematuros com baixo peso que

contraíram o microrganismo durante o nascimento. Existe evidência de associação entre o *Ureaplasma urealyticum* e infertilidade.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os micoplasmas são bactérias desprovidas de parede celular, são pleomórficas e somente crescem em meios hipertônicos, contendo 20% de soro de cavalo e extrato de levedura. O método de Gram não tem valor na pesquisa desta bactéria.

Como fazem parte da microbiota genital normal, as culturas para seu isolamento necessitam ser quantitativas. Títulos iguais ou superiores a 10^3 UTC (unidades trocadoras de cor) são considerados clinicamente significativos. Em alguns casos pode ser necessária a realização do antibiograma que é feito em meio sólido ou líquido, utilizando-se pelo menos duas concentrações de cada antibiótico. Os antibióticos freqüentemente utilizados incluem: tetraciclina, eritromicina, roxitromicina, ofloxacina e tianfenicol.

Testes sorológicos não são utilizados na rotina, para infecções genitais por micoplasmas. Os principais testes utilizados no diagnóstico de infecções genitais por micoplasmas incluem:

- Cultura quantitativa de materiais, tais como: secreção vaginal, uretral, cervical, urina de 1º. jato, esperma e líquido prostático em meios U-9, M-42 e A-7. Títulos iguais ou maiores que 10^3 UTC (unidades trocadoras de cor) são clinicamente significativos.
- Testes sorológicos: utilizados somente para infecções pulmonares ou articulares.
- Antibiograma: tetraciclina, eritromicina, roxitromicina, ofloxacina e tianfenicol são testados rotineiramente.

OUTRAS INFECÇÕES GENITAIS E SEUS PATÓGENOS

Amnionite	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B) principal patógeno, <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilus</i> spp., <i>Streptococcus pyogenes</i>
Bartolinite	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>U. urealyticum</i> , Enterobacterias. Agentes mais raramente relacionados: Anaeróbios, <i>C. trachomatis</i> , <i>S. aureus</i> .
Endometrite/salpingite	<i>Bacteroides</i> spp., <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> (importante em salpingite), <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i> , Enterobactérias, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Actinomyces</i> spp. (associado ao uso de DIU)
Epididimite/orquite	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , Enterobacterias, <i>Pseudomonas</i> spp.
Prostatite	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , Enterobactérias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. aureus</i> (abscesso)
Úlceras genitais	Cancro mole - <i>Haemophilus ducreyi</i> Cancro duro - <i>Treponema pallidum</i> (sífilis) Herpes genital - <i>Herpes simplex</i> vírus.
Uretrites e cervicites	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Herpes simplex</i> virus, <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Haemophilus</i> spp. (no homem).

9. INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

INTRODUÇÃO

A maioria das infecções de vias aéreas superiores são autolimitadas, de etiologia viral, porém outras são provocadas por bactérias e exigem tratamento antimicrobiano. Serão consideradas IVAS (infecções de vias aéreas superiores) infecções da laringe, nasofaringe, orofaringe, nariz, seios paranasais e ouvido médio. Como muitas vezes são indistinguíveis clinicamente, o diagnóstico laboratorial é fundamental.

A identificação de uma bactéria patogênica ou potencialmente patogênica não necessariamente indica seu envolvimento na infecção, pois estes microrganismos podem também ser detectados em portadores como é o exemplo do *Haemophilus influenzae*. Desse modo, o conhecimento da flora normal do trato respiratório superior é essencial para a interpretação dos resultados da cultura.

A orofaringe contém uma microbiota mista com grande densidade de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, incluindo *Streptococcus* alfa hemolíticos e não hemolíticos, *Streptococcus* beta hemolíticos não pertencentes ao grupo A, *Neisserias* não patogênicas, *Haemophilus* spp., difteróides, *Staphylococcus* sp, *Micrococcus* spp., Anaeróbios (*Bacteroides* spp, *Fusobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp.).

Alguns patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, enterobactérias e leveduras como *Candida albicans* podem ser componentes transitórios da flora de orofaringe em indivíduos saudáveis, sem desenvolvimento de doença. O trato respiratório abaixo da laringe não possui flora residente normal. A mucosa nasal anterior é frequentemente colonizada por *Staphylococcus epidermidis* e difteróides, e alguns indivíduos são portadores intermitentes ou definitivos de *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, os seios paranasais e o ouvido médio não possuem flora microbiana.

QUADRO CLÍNICO, AGENTES ETIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Faringite *	<p>O agente mais freqüente de faringite bacteriana é o <i>Streptococcus pyogenes</i>. Em pacientes hospitalizados o trato respiratório superior pode ser colonizado por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> e outras enterobactérias. Esses microrganismos não são patógenos de faringe e não devem ser reportados nos resultados de rotina. Porém se o paciente for imunocomprometido, e houver solicitação do médico, essas bactérias serão consideradas para laudo e teste de sensibilidade.</p> <p>Alguns vírus tais como: adenovírus, herpes simplex, influenza, parainfluenza, coxsackie A e EBV (mononucleose infecciosa), produzem faringite acompanhada de rinorréia, tosse, exantema e às vezes febre, sendo o diagnóstico sorológico ou através de provas moleculares.</p>
Laringite e Epiglotite	<p>A laringite aguda, na grande maioria das vezes, é de etiologia viral. Culturas para pesquisa de agentes bacterianos são indicadas apenas na suspeita de difteria. A epiglotite, também chamada de "crupe", geralmente tem etiologia bacteriana (<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B). Mas a coleta com "swab" diretamente da epiglote é contra-indicada por duas razões: em primeiro lugar, a manipulação ou irritação da epiglote edemaciada pode provocar quadro de obstrução; em segundo lugar, o isolamento de <i>H. influenzae</i> b pode não ocorrer.</p> <p>O diagnóstico é fundamentalmente clínico, porém hemoculturas (> 50% dos casos são bacterêmicos) podem confirmar a etiologia. O meio de cultura deve ser enriquecido com fatores X e V ou adicionado de sangue de cavalo aquecido, sendo importante realizar teste de suscetibilidade com pesquisa de beta lactamases.</p>
Sinusites	<p>Os seios paranasais comunicam-se com a cavidade nasal, sendo então susceptíveis a infecções por microrganismos habitantes do trato respiratório superior. A sinusite aguda é frequentemente secundária à infecção viral de vias aéreas superiores. Outros fatores predisponentes são: alergia, desvio do septo nasal, pólipos, e em pacientes hospitalizados, entubação orotraqueal prolongada. A infecção de seios paranasais pode se propagar a tecidos adjacentes, como células etmoidais (levando a celulite periorbital), abscessos cerebrais e meningites.</p> <p>Os microrganismos mais comumente identificados são <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> não b, anaeróbios estritos, <i>Streptococcus</i> spp., e <i>Branhamella catarrhalis</i>. Em sinusites de origem intra-hospitalar, os agentes mais freqüentes são: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, e fungos como <i>Candida</i> spp.</p>

Otitis	<p>Otite Média: infecção do ouvido médio, geralmente acomete crianças entre 3 meses e 3 anos de idade. O diagnóstico etiológico só pode ser feito através de cultura do fluido do ouvido médio, mas como a obtenção deste material implica em realização de timpanocentese, não é realizado a não ser que haja indicação clínica de drenagem. Os agentes mais comumente isolados são <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Streptococcus pyogenes</i>.</p> <p>Otite Externa: infecção do canal auditivo externo, geralmente causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Proteus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
Nasofaringe e Mucosa Nasal	<p>Nasofaringe: o material coletado para diagnóstico da infecção deve ser aspirado através do nariz; utilizado para o diagnóstico de coqueluche, Mycoplasma e alguns casos de difteria. Para detecção de meningococo a amostra deve ser coletada com swab ou por aspiração e semeada imediatamente em meios adequados. Deve ser lembrado que para detecção de portadores de meningococo, deve ser coletado material com zaragatoa de arame, e semeado imediatamente em meios adequados.</p> <p>Nariz: 20 a 25% dos indivíduos sadios são portadores de <i>Staphylococcus aureus</i> no nariz, e no ambiente hospitalar esta taxa pode aumentar. Alguns autores associam a colonização nasal por este microrganismo com o aumento do risco de infecção hospitalar em pacientes submetidos a cirurgias (cardíaca, por exemplo) e a programas de diálise peritoneal contínua (CADP). Nestes casos de risco, colher material das narinas para pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>, com teste de susceptibilidade à mupirocina (antibiótico de uso tópico utilizado para erradicação do microrganismo da mucosa nasal).</p>
Candidíase oral	Comum em neonatos e pacientes imunocomprometidos, principalmente após utilização de antibióticos de largo espectro. O diagnóstico é direto, feito através de esfregaço em lâmina do exudato corado pelo Gram ou KOH, onde são visualizadas leveduras.

Os meios de cultura mais utilizados para semeadura, de materiais obtidos das vias aéreas superiores são o Ágar Chocolate (com sangue de cavalo) e Ágar Sangue incubados em atmosfera de 5% de CO₂, e Ágar Mac Conkey. Na rotina não se recomenda fazer enriquecimento, nem fazer uso de meios seletivos. Na suspeita de infecções por anaeróbios usar meios e condições apropriadas para o cultivo destas bactérias.

Para cultura do bacilo diftérico é recomendável encaminhar a Laboratório de Saúde Pública. O meio seletivo é o meio de Ágar Sangue cistina-telurito. O bacilo também cresce em Ágar Sangue, sendo opcional fazer enriquecimento em Ágar Loeffler azul de metileno.

*** Principais agentes etiológicos de faringites**

Agente	Manifestação clínica	Estimativa de casos (%)
Rhinovirus	Resfriado	20
Coronavírus	Resfriado	5
Adenovirus	Doença respiratória aguda ou febre faringo-conjuntival	5
<i>Herpes simplex vírus</i>	Gengivite, estomatite e faringite	4
Outros vírus	Herpangina, mononucleose, etc	≤1
Influenza vírus	gripe	2
Parainfluenza vírus	resfriado	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Faringite, amigdalite e escarlatina	15-30
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico do grupo C	Faringite e amigdalite	5
<i>C. diphtheriae</i>	Difteria	raramente
<i>Neisseriae gonorrhoeae</i>	Faringite	raramente
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Faringite	raramente
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Faringite, pneumonia	raramente

10. INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR

PNEUMONIA DA COMUNIDADE

Apesar dos progressos diagnóstico-terapêuticos, as pneumonias ainda representam a causa mais importante de morte atribuída à doença infecciosa nos países desenvolvidos, em parte pela dificuldade de se estabelecer o agente etiológico e dirigir a terapêutica específica, pela grande diversidade de agentes possíveis. Cerca de 30 a 60% das pneumonias adquiridas na comunidade não revelam nenhum agente entre os mais freqüentemente pesquisados e isoladas, ficando apenas com diagnóstico clínico ou de imagem.

Agentes mais isolados em pneumonias da comunidade

Agente	Prevalência (%)	Principais sintomas	Fatores predisponentes
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20-60	Respiratórios: - tosse	- doença pulmonar obstrutiva crônica
<i>Haemophilus influenzae</i>	3-10	- expectoração	- diabetes
<i>Staphylococcus aureus</i>	3-5	- dispnéia	- alcoolismo
Anaeróbios da cavidade oral	6-10	- dor torácica	- crises convulsivas
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1-3	Gerais: - febre	- insuficiência cardíaca congestiva
Outros Gram negativos	3-10	- mal-estar	- anemia falciforme
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	5-17	- mialgia	- imunossupressão
<i>Legionella pneumophila</i>	2-8	- sudorese	- idade avançada
Vírus respiratórios	2-15	- fadiga	- doença respiratória prévia (em geral viral)
		- cefaléia	- ventilação mecânica
		- náuseas	- etc
		- etc	

As amplas variações ocorrem em diferentes populações e outros fatores epidemiológicos (época do ano, surtos, faixa etária, etc.). Nas crianças a distribuição tem particularidades marcantes com diferentes faixas etárias em função da experiência imunológica com os potenciais agentes infecciosos, o que reduziu a frequência nas comunidades vacinadas.

Existe uma interessante associação entre fatores predisponentes e agentes etiológicos que podem facilitar a pesquisa ou interpretação de achados microbiológicos.

Associação entre fatores predisponentes e agentes etiológicos

Fator	Agente Etiológico	Fator	Agente Etiológico
Alcoolismo	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Anaeróbios, Enterobactérias	Exposição a animais da área rural ou gata recém-parida	<i>Coxiella burnetii</i> (febre Q - áreas endêmicas)
Doença obstrutiva pulmonar crônica e fumante	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Legionella</i> spp.	Infecção por HIV precoce	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Asilos e outras comunidades de assistência	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Enterobactérias, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , Anaeróbios, <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Viagem ao sudeste norte-americano	<i>Coccidioides immitis</i>

Má higiene dentária	Anaeróbios	Surtos de gripe	Influenzavirus, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> (A), <i>Haemophilus influenzae</i>
Exposição a pombos ou fezes	<i>Histoplasma capsulatum</i> (Histoplamose)	Pneumonia de aspiração	Anaeróbios e pneumonia química
Exposição a pássaros	<i>Chlamydia psitaci</i> (Psitarcose)	Doença pulmonar crônica, fibrose cística ou bronquiectasia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Exposição a coelhos	<i>Francisella tularensis</i> (Tularemia)	Usuário de drogas	<i>S. aureus</i> , Anaeróbios, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Distribuição da frequência de agentes etiológicos em função da idade

Idade	Agente por ordem de frequência
Do nascimento até 20 dias	<i>Streptococcus agalactiae</i> (B), Enterobactérias, Citomegalovírus, <i>Listeria monocytogenes</i>
3 semanas a 3 meses	<i>Chlamydia trachomatis</i> , Vírus respiratório sincicial, Parainfluenza vírus 3, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
4 meses a 4 anos	Vírus respiratório sincicial, Parainfluenza vírus, influenza vírus, adenovírus, rinovírus, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5 a 15 anos	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Outras causas mais raras de pneumonia

Agentes associados a pneumonia	Exposição
Anthrax (<i>Bacillus anthracis</i>)	Animais em área rural ou suas fezes
Brucelose (<i>Brucella</i> spp.)	Animais, leite não pasteurizado, cuidados veterinários
Leptospirose (<i>Leptospira</i> spp.)	Roedores silvestres; água contaminada com urina de animal doente; animais domésticos doentes
<i>Pasteurella multocida</i>	Cães e gatos contaminados
Tifo murino (<i>Yersinia pestis</i>)	Ratos, esquilos, coelhos e outros roedores silvestres
<i>Hantavirus</i>	Urina, fezes e saliva de roedores silvestres

PNEUMONIA HOSPITALAR

Considerando-se as diferentes topografias associadas às infecções hospitalares, as localizadas no trato respiratório inferior, têm grande importância pela frequência em que ocorrem e pela morbidade associada. Estas infecções são classificadas basicamente em quadros de traqueobronquite e pneumonia.

A pneumonia de origem hospitalar é definida como aquela que aparece após um período maior ou igual a 48 horas de admissão e não está incubada no momento da hospitalização. Segundo dados da literatura, ocorre entre 6 a 10 casos a cada 1000 admissões hospitalares.

Entre as pneumonias, aquelas associadas com ventilação mecânica através de entubação orotraqueal ou traqueostomia, são as mais frequentes. São definidas para pacientes sob ventilação mecânica em um período igual ou superior a 48 horas. Nesta situação a incidência de infecção é de 7 a 21 vezes maior à que ocorre em pacientes que não necessitam de respirador.

Dentre as infecções hospitalares, a infecção pulmonar é a que leva a morte com maior frequência, com um risco maior na Unidade de Terapia Intensiva. A prevalência de pneumonias varia entre 10 e 65%, com 13 a 55% de casos fatais. Neste mesmo tipo de Unidade, dados do National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) mostram a taxa de infecção respiratória associada à ventilação mecânica por 1000 procedimentos-dia, variando de 5 casos em UTI pediátrica a 13 casos em UTI cirúrgica.

De uma maneira geral os microrganismos podem alcançar o trato respiratório pela aspiração de secreções da orofaringe, pela inalação de aerossóis contendo bactérias, pela translocação de microrganismos do trato gastrointestinal ou pela disseminação hematogênica de um foco a distância. Ainda, para que a infecção respiratória ocorra é necessário existir a perda das defesas do hospedeiro, um inóculo suficiente para alcançar o trato respiratório ou a presença de um microrganismo altamente virulento.

Os agentes mais frequentemente isolados são:

- Bacilos Gram negativos
- Enterobactérias: *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp.
- Bacilos Gram negativos não fermentadores: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e outras espécies, etc.
- Cocos Gram positivos, principalmente *Staphylococcus aureus*.
- Outros agentes, tais como *Legionella pneumophila* e Vírus Respiratório Sincicial (VRS) aparecem em casos de surto e em pacientes imunodeprimidos, assim como *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis carinii*.

Patógenos isolados em 4.389 pneumonias em UTI nos Estados Unidos de 1992–97 NNIS

Patógenos	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Enterobacter</i> spp.	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
<i>Acinetobacter</i> spp.	6
<i>Candida albicans</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Enterococcus</i> spp.	2
Outras enterobactérias	8
Outros fungos	2,8

Vários critérios utilizados para definição de pneumonia hospitalar foram propostos. Em geral, incluem a presença de um novo ou progressivo infiltrado pulmonar, febre, leucocitose e secreção traqueobrônquica purulenta.

Muitos destes achados são inespecíficos já que febre pode ser causada por diversos fatores como: reação a drogas, infecção em outro foco, transfusão sanguínea e resposta inflamatória extra-pulmonar.

O mesmo ocorre com a congestão, presente em embolia pulmonar, atelectasia, insuficiência cardíaca, hemorragia pulmonar, trauma pulmonar, tumor, aspiração química e reação à drogas.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS PNEUMONIAS

RECURSOS DIAGNÓSTICOS

- Exame físico
- Exame do escarro
- Aspirado transtraqueal
- Broncoscopia com fibra óptica e lavado bronco-alveolar
- Aspirado endotraqueal cego
- Biópsia pulmonar
- Hemocultura (1 a 16% de positividade)
- Exames imunológicos (imunofluorescência, ELISA, etc.)
- Punção de derrame pleural para realização de exames bioquímicos, citológicos e microbiológicos.
- Raio X simples (AP + perfil)
- Tomografia computadorizada

O diagnóstico das infecções do trato respiratório inferior, do ponto de vista microbiológico, é dificultado pela contaminação da amostra, em nível do trato respiratório superior, durante a coleta.

Critérios de aceitação de amostras clínicas para exame

Amostras aceitáveis	Amostras inaceitáveis
Escarro	Saliva (enviada como escarro)
Aspirado traqueal ou transtraqueal	Escarro coletado por 24 horas
Lavado bronco-alveolar, escovado brônquico e biópsia brônquica	Swab endotraqueal, cânula ou tubo endotraqueal
Punção pulmonar e biópsia pulmonar	

ESCARRO

Apesar de poder ser útil em pacientes com tosse produtiva e com capacidade de expectorar e a presença de escarro purulento encontrar-se na maioria dos critérios utilizados para o diagnóstico de pneumonias, a análise desta secreção é bastante controversa do ponto de vista de sensibilidade e especificidade.

Aspectos da análise macroscópica do escarro que podem ser úteis para sugestão de agentes ou patologias: Cor, quantidade, consistência e cheiro.

- Escarro purulento – pneumonia bacteriana (embora nas pneumonias por vírus ou micoplasma a infecção secundária pode oferecer os mesmos achados em cerca de 30 a 50% dos casos)
- Expectoração matinal, abundante e fétida - bronquiectasia
- Expectoração escassa ou aquosa (mucóide) - pneumonias atípicas
- Escarro avermelhado, mucóide - *Klebsiella pneumonia*
- Escarro fétido associado a pneumonia aspirativa - anaeróbios

Bacterioscopia

A bacterioscopia do escarro pela coloração de Gram é um recurso simples, rápido e barato, podendo ser muito útil para orientação terapêutica quando são atendidos os seguintes itens:

- Um material purulento e representativo é analisado;
- Os analistas são experientes;
- Informações clínicas e/ou o clínico participam da interpretação;

- Os achados são bem definidos, como por exemplo, o predomínio ou presença de mais de 10 cocobacilos Gram positivos em forma de chama de vela, característicos de pneumococo em imersão (X1000) - a especificidade nesse caso é de 85%.

Algumas medidas relacionadas à coleta e processamento da amostra podem tornar os resultados obtidos com este espécime de maior utilidade. A remoção de próteses e gargarejo com água imediatamente antes da coleta pode reduzir substancialmente a contaminação da amostra. O único cuidado é impedir o uso de substâncias com conteúdo bactericida.

Prefere-se colher a primeira amostra de escarro da manhã por ser um material mais concentrado, utilizando-se a porção mais purulenta para análise. A coleta por um período de 24 horas é inadequada, já que durante o dia passa a ocorrer diluição da amostra, morte de alguns agentes fastidiosos, e em contrapartida, o crescimento bacteriano de outros microrganismos.

Segundo os achados de LENTINO e LUCKS, relatados por KONEMAN et al (1997), a interpretação do resultado das culturas de escarro em relação às pneumonias foi de que:

- 26,5% de amostras de escarro purulento eram de pacientes mostrando nenhum sinal clínico ou radiológico de pneumonia.
- 40% das amostras de escarro provenientes de pacientes com pneumonia não eram profundamente expectorados, refletindo a presença de secreção oral.
- Somente 10% de pacientes produzindo escarro não purulento tinham pneumonia.
- Somente 56,8% dos pacientes com pneumonia produziam escarro purulento.

Ainda em casos comprovados de pneumonia pneumocócica, com bacteremia e escarro revelando o pneumococo na coloração de Gram podem apresentar cerca de 50% de culturas de escarro negativas, o mesmo podendo ocorrer com pneumonias por *Haemophylus*. A presença de enterobactérias em culturas de escarro deve ser interpretada com muita cautela, pois em cerca de 1/3 das culturas estas bactérias provenientes da orofaringe podem contaminar o material obtido para análise. A avaliação da qualidade do escarro, considerando a proporção entre o número de células epiteliais e leucócitos, é um procedimento que deve ser considerado de rotina, para caracterizar a aceitabilidade da amostra ou não.

Através da coloração de Gram (observação de pelo menos 10 campos com aumento de 10X), as amostras devem ser classificadas em grupos de acordo com as tabelas abaixo. São significativos os materiais do grupo 5 ou quando a quantidade de células epiteliais, neutrófilos e muco resultarem em somatória positiva. Recomenda-se que escarros não qualificados, não sejam semeados e que o fato seja reportado ao requisitante do exame.

Avaliação da qualidade do escarro

Grupos	Células epiteliais	Leucócitos	Neutrófilos	"Score"	Células Epiteliais	"Score"
Grupo 1	≥ 25	≤ 10	< 10	0	10-25	-1
Grupo 2	≥ 25	10-25	10-25	+1	> 25	-2
Grupo 3	≥ 25	≥ 25	> 25	+2		
Grupo 4	10-25	≥ 25	Muco	+1		
Grupo 5	<10	≥ 25				

No caso da necessidade do processamento da amostra nestas condições, é recomendável uma observação no laudo final do exame, dizendo que o material coletado está contaminado com material de orofaringe. Faz-se exceção a esta regra, escarro com o objetivo de diagnosticar presença de micobactérias, vírus, fungos (*Paracoccidioidis brasiliensis*, *Histoplasma spp.*, etc.) e aqueles provenientes de pacientes imunodeprimidos.

- *Pneumocistis carinii* - para diagnóstico de pneumonia por *Pneumocistis carinii* em pacientes com HIV ou imunossuprimidos, o escarro pode ser útil em mais de 50% dos casos, pelo uso da coloração de Giemsa ou Gomori methenamina prata ou azul de toluidina ou ainda de

imunofluorescência com anticorpos monoclonais que apresentam uma sensibilidade de 80% e especificidade de 90%.

- *Legionella pneumophila* - para diagnóstico de legionelose (*Legionella pneumophila*) o escarro ou outros materiais, obtidos por vias invasivas ou não, podem ser úteis no diagnóstico pela imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais.
- *Chlamydia pneumoniae* - os recursos imunológicos para teste no escarro (Elisa e imunofluorescência) oferecem baixa sensibilidade e especificidade para caracterização da pneumonia por *Chlamydia pneumoniae*. Quando agentes como *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella* spp., e *Pneumocystis carinii* são encontrados no escarro, devem ser considerados patogênicos, independente da avaliação de qualidade do escarro.

A amostra deve ser encaminhada diretamente ao laboratório e se não processada no prazo de 1-2 horas pode resultar em perda de patógenos fastidiosos e em proliferação de bacilos Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores).

Indicação de outras técnicas para obtenção de material para diagnóstico de pneumonia:

- má resposta terapêutica
- gravidade do quadro ou paciente imunossuprimido
- falta de produção de escarro
- exames realizados não foram conclusivos (não isolou nada ou isolou enterobactérias, ou *Candida* ou mais de um agente)
- possibilidade de superinfecção

As técnicas broncoscópicas caracterizam-se pela possibilidade de visualizar diretamente a árvore respiratória levando a menor risco de dano e direcionamento do fibroscópio ao local desejado, enquanto as não broncoscópicas podem ser realizadas mais rapidamente com menor risco de desaturação de oxigênio.

ASPIRADO DE SECREÇÃO TRAQUEAL

Apesar de aspirados de secreção traqueal serem rapidamente obtidos em pacientes entubados, esta é uma amostra bastante questionável, devido a sua baixa especificidade. Isto se deve ao fato de que a colonização endotraqueal ocorre rapidamente após a intubação e ventilação mecânica.

A utilização de técnicas quantitativas de aspirados endotraqueais feito às cegas, com o objetivo de diferenciar colonização de infecção com valores de corte de $> 10^5$ UFC/ml, é proposto por alguns autores (Jourdain & cols, 1995).

A sensibilidade preditiva de pneumonia associada a ventilação foi comparável com o BAL e com a técnica do escovado protegido, embora menos específico. Alguns trabalhos mostram até 82% de sensibilidade e 83% de especificidade para o aspirado endotraqueal, mas não há unanimidade.

Independentemente da metodologia empregada, tende a mostrar resultados mais favoráveis associados ao valor preditivo negativo e sua melhor indicação é quando não se pode fazer a broncoscopia. A mortalidade da pneumonia associada à ventilação mecânica não mostrou diferença quando a terapêutica se baseou em técnicas broncoscópicas ou não.

ASPIRADO TRANSTRAQUEAL

Trata-se de uma técnica bastante utilizada na década de 70, mas que atualmente devido aos riscos que leva para o paciente (enfisema subcutâneo, estímulo vaso-vagal, hemoptise), está preterido em função do aparecimento de procedimentos mais promissores. Outro fato relevante é o elevado número de resultados falso-positivos, pelo isolamento de flora colonizadora do trato respiratório superior.

LAVADO BRÔNQUICO NÃO DIRIGIDO

Método simples, de baixo custo e seguro recomendado para rotina de vigilância bacteriológica em pacientes ventilados mecanicamente.

No estudo que levou estas a conclusões, observou-se que durante dias anteriores ao paciente apresentar um quadro de pneumonia, havia aumento significativo de um número inferior ou igual a 10^3 UFC/ml para maiores ou iguais a 10^5 UFC/ml; ainda revelou queda do número de colônias em pacientes que responderam a antibioticoterapia, em contraste com aqueles que mostraram uma

progressiva deterioração clínica, para os quais não existiu queda significativa na contagem de colônias.

LAVADO BRONCO-ALVEOLAR E ESCOVADO BRONCO-ALVEOLAR

Das técnicas endoscópicas o lavado e o escovado bronco-alveolar são as mais utilizadas. O escovado bronco-alveolar obtém um maior volume de amostra, o que aumenta a sensibilidade do método e permite que se realize um maior número de procedimentos diagnósticos além da cultura, após a citocentrifugação da amostra. Dentre eles incluem-se colorações para identificação de organismos específicos, porcentagem de macrófagos e leucócitos contendo microrganismos (nas pneumonias considera-se relevante acima de 2%), e presença de fibras de elastina como indicador de necrose pulmonar.

São referidos valores de sensibilidade e especificidade para o lavado bronco-alveolar variando de 80-100% e 75-100% respectivamente e para o escovado de 65-100% e 60-100%.

ESCOVADO PROTEGIDO

O volume recuperado de secreção pulmonar por um escovado é aproximadamente de 0,001ml. O escovado é diluído em 1 ml de meio, resultando na diluição da bactéria em 100 a 1000 vezes. Portanto o crescimento de pelo menos 10^3 UFC/ml em placas indica uma concentração inicial de 10^5 a 10^6 bactérias na secreção pulmonar.

BAL OU LAVADO BRONCO-ALVEOLAR

No lavado bronco-alveolar recupera-se 5 a 10 vezes o volume de bactérias do escovado, visto que a diluição de 1 ml de secreção se faz em 10 a 100 ml de soro fisiológico, de forma que a contagem de 10^4 UFC/ml a partir do material recebido no laboratório, representa 10^5 a 10^6 UFC/ml na secreção pulmonar. Em pacientes com forte suspeita clínica de pneumonia, valores a partir 10^2 - 10^3 de cada agente isolado para escovado e 10^3 - 10^4 UFC/ml para o lavado podem também ser significativos; o uso de antimicrobianos estaria recomendado.

BIÓPSIAS

Podem ser feitas de formas variadas: percutânea, através de broncoscopia, por meio do fibroscópio, pela toracoscopia e a céu aberto. Indicado nos casos de imunocomprometidos e crianças com má evolução à terapêutica empírica.

Punção biópsia pulmonar - trata-se de um procedimento, que quando resulta em cultura positiva, é bastante fidedigno, já que os problemas com contaminação com a flora do trato respiratório superior inexistem. Os relatos da literatura revelam que em situações variadas, o diagnóstico etiológico das infecções, com esta técnica, ocorreu entre 30% a 82% dos casos estudados e falso-negativos de cerca de 18%. Complicações mais importantes são pneumotórax e sangramento em casuísticas que variam de 5 a 39%.

Biópsia transbrônquica - os resultados diagnósticos são semelhantes à punção pulmonar aspirativa, mas revelaram menor índices de complicações.

Biópsia pulmonar - a biópsia a céu aberto, método definitivo para o diagnóstico das pneumonias, é um procedimento pouco realizado. Está indicada em casos sem melhora clínica, em que não foi possível isolar o microrganismo por outras técnicas ou que há necessidade de diagnóstico específico com maior rapidez. Convém salientar que de nada adianta obter boas amostras para estudo microbiológico quando se emprega técnica laboratorial convencional, isto é, morosa e de baixa sensibilidade.

TORACOSCOPIA

A toracoscopia tem sido pouco utilizada, embora resultados sejam muito favoráveis, com achados diagnósticos superiores a 90% e baixa taxa de complicações.

DERRAME PLEURAL

O derrame pleural costuma ocorrer, aproximadamente, em pneumonias causadas por *Pneumococo* 10%, Bacilos Gram negativos 50-70% e *Streptococcus pyogenes* (grupo A) 95%. Além da bacterioscopia, baciloscopia (Micobacterias) e culturas (bactéria, micobactérias, fungos), o material

deverá ser reservado para estudo citológico e bioquímico para afastar outras causas de derrame com infiltrados pulmonares:

- Infarto pulmonar
- Insuficiência cardíaca
- Tumor
- Doenças do colágeno, etc.

HEMOCULTURA

Através da hemocultura também pode se isolar o microrganismo de um processo respiratório considerando-se que isto ocorre entre 1 a 16 % dos casos, no entanto não deve ser utilizada de forma isolada para o diagnóstico de pneumonia. É altamente específico e é indicada em pacientes com pneumonia que necessita de hospitalização.

CONTAGENS BACTERIANAS SIGNIFICATIVAS

O cálculo dos valores limítrofes para definição de infecção para amostras do trato respiratório, deriva da concentração de microrganismos encontrada em culturas do tecido pulmonar infectado. Comparando-se o número de bactérias na amostra, estima-se o número na secreção original. As infecções pulmonares clinicamente significativas contêm pelo menos 10^4 UFC/g de tecido.

Significado das contagens bacterianas em relação à amostra clínica

Material	Volume obtido	Fator de diluição	Valor significativo
Escarro, aspirado, endotraqueal, aspirado por broncoscopia	≥ 1 ml	1	10^5 – 10^6 UFC/ml
Escovado brônquico protegido	1 a 10 μ l diluídos em 1ml	1/100 – 1/1000	10^3 UFC/ml
Lavado broncoalveolar (BAL)	1ml diluído em 10 a 100 ml	1/10 – 1/100	10^4 UFC/ml

PACIENTES NEUTROPÊNICOS E IMUNOSSUPRIMIDOS

Além dos agentes relatados como causa de pneumonia em crianças e adultos, devem ser valorizados achados clinicamente compatíveis de:

- Bactérias: *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium jeikeium*, *Bacillus* spp., *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rodococcus* spp.
- Fungos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Candida* spp., *P. carinii*, *Cryptococcus neoformans*
- Protozoários: *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides stercoralis*

PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO DE AMOSTRAS

Meios recomendados para a cultura das amostras do trato respiratório:

- Ágar sangue
- Ágar Mac conkey
- Ágar chocolate
- Ágar sangue suplementado para anaeróbios, para amostras clínicas para as quais recomenda-se fazer o isolamento de anaeróbios.
- Quando é indicada cultura para *Legionella* spp., fungos, micobactérias, *Chlamydia* e vírus, acrescentam-se os meios necessários a estas rotinas específicas. A pesquisa por imunofluorescência com anticorpos monoclonais, e os métodos moleculares são mais recomendados para a detecção desses microrganismos.

A semeadura da amostra e interpretação do número de colônias no caso da utilização de técnicas quantitativas, poderá ser feita de uma das formas abaixo:

- Após homogeneização da amostra, semear 10 μ l, diretamente nas placas, utilizando-se alças calibradas descartáveis ou pipeta com ponteiros estéreis.

Nº de colônias na placa após Incubação "overnight"	Interpretação em UFC/ml
< 10	< 10 ³
10 a 100	10 ³ a 10 ⁴
100 a 1000	10 ⁴ a 10 ⁵

Observação: Para o Lavado broncoalveolar considerar a diluição pelo volume injetado e multiplicar por 100. P.ex., se a leitura for 50 colônias, multiplicar por 100 (volume da alça) e multiplicar por 100 (diluição da coleta). Resultado final = $5 \times 10 \times 10^2 \times 10^2 = 5 \times 10^5$ UFC/ml

- Usar diluições de:
 - 1/10: 10 µl com alça calibrada semeada no Ágar Chocolate
 - 1/100: 1 ml do material diluído em 9 ml de solução salina e semeando-se 10 µL desta solução com alça calibrada na placa de Ágar Chocolate
 - 1/1000: usar a solução anterior e semear 1 µL com alça calibrada na placa de Ágar Mac Conkey.

Para expressão do resultado em ml o número de colônias obtido deverá ser corrigido pelo fator da diluição e correlacionado com a quantidade de amostra semeada.

- prepara-se uma diluição de 1:20 (0,5 ml de fluido em 9,5mL de solução salina estéril). Deste caldo semeia-se 50 µl em cada um dos meios selecionados.

Nº de colônias na placa após incubação "overnight"	Interpretação em UFC/ml
2-24	10 ³
25-249	10 ⁴
≥ 250	10 ⁵

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A'court, C.H.D., Garrard, C.S., Crook, D., Bowler, I. and Conlon, C. **Microbiology lung surveillance in mechanically ventilated patients using non-directed bronchial lavage and quantitative culture.** Quarterly J Med, 86: 635-648, 1993.
2. Amsel, R., Totten, P.A., Spiegel, C.A., Chen, K.S., Eschenbach, D.A., and HOLMES, K.K. **Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations.** Am J Med, 74: 14-22, 1983.
3. Andriole, V.T. **Urinary tract infection.** Infect Dis Clin North Am, 01(4), 1976.
4. Applebaun, P.C. and Beckwith, D.G. **Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium.** J Clin Microbiol, 17:48-51, 1983.
5. Baron, E.J. and Tenover, S.M. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology.** 8th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1990.
6. Baron, E.J., Cassel, G.H. and Duffy, L.B. **Laboratory diagnosis of female genital tract infection.** CUMITECH 17A. Coord. Ed. E.J. Baron, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993.
7. Barry, A.L., Smith, P.B. and Turck, M. **Laboratory diagnosis of urinary tract infection.** CUMITECH 2. Coord. Ed. T.L. Gavan, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1975.
8. Bartlett, R.C., Ellner, P.D. and Washington II, J.A. **Blood culture.** CUMITECH 1. Coord. Ed. J.C. Sherris, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1974.
9. Bartlett, R.C. **Medical Microbiology: quality cost and clinical relevance.** John Wiley & Sons, New York, 1974.
10. Baselski, V.S. and Wunderink, R.G. **Bronchoscopic diagnosis of pneumonia.** Clin Microbiol Rev, BENNETT, J.V., BRACHMAN, P.S. Hospital Infections, 4th ed., Lippincott-Raven, 1998.
11. Bernstein, J.M. **Treatment of community-acquired pneumonia.** IDSA Guidelines CHEST, 115:9S-13S, 1999.
12. Bisno, A.L. **Acute pharyngitis.** N Engl J Med, 344(3): 205-211, 2001.
13. Boop, C.A. **Manual of clinical microbiology.** 7th Ed., Ed. Murray, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1999.
14. Bowler, P.G., Duerden, B.I. and Armstrong, D.G. **Wound Microbiology and associated approaches to wound management.** Clin Microbiol Rev, 14:244-269, 2001.
15. Bryan, F.L. **Manual of clinical microbiology.** 4th Ed., Ed. E.H. Lennette, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1985.
16. Cardoso, C.L., Muraro, C.B., Siqueira, V.L.D. and Guilhermetti, M. **Simplified technique for detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine.** J Clin Microbiol, 36:820-823, 1998.
17. Clarridge, J.E., Johnson, J.R. and Pezzlo, M.J. **Laboratory diagnosis of urinary tract infection.** CUMITECH 2B. Coord. A.L. Weissfeld, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998.
18. Clarridge, J.E., Pezzlo, M.T. and Vosti, K.L. **Laboratory diagnosis of urinary tract infection.** CUMITECH 2A. Coord. A.L. Weissfeld, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1987.
19. Cohen, M.L. **The epidemiology of diarrheal disease in the United States.** Infect Dis Clin North Am, 02:557-570, 1998
20. Cornick, N.A. and Gorbach, S.L. **Campylobacter.** Infect Dis Clin North Am, 02:643 -654, 1988.
21. Duncan, I.B.R., Bannatyne, R.M., Clansen, C. and McCarthy, L.R. **Laboratory Diagnosis of Upper Respiratory Tract Infections.** Cumitech 10. American Society for Microbiology, Washington DC, 1979.
22. Dunne Jr. W.M., Nolte, F.S. and Wilson, M.L. **Blood Culture III.** CUMITECH 1B. Coord. Ed. J.A. Hindler, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1997.

23. Eschenbach, D.A., Hillier, S.R., Critchlow, C., Stevens, C., DeRouen, T. and Holmes, K.K. **Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis.** Am J Obstet Gynecol, 158:819-828, 1988.
24. Eschenbach, D.A., Pollock, H.M. and Schachter, J. **Laboratory diagnosis of female genital tract infection.** CUMITECH 17. Coord. Ed. S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1983.
25. Evangelista, E.T. and Beilstein, H.R. **Laboratory diagnosis of gonorrhoea.** CUMITECH 4A. Coord. Ed. C. Abramson. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993.
26. Ferreira, W. e Ávila, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes.** São Paulo, Guanabara-Koogan, 2a. Ed., 2001.
27. Forbes, B.A., Sahm, D.S. and Weissfeld, A.S. **Bayley & Scott's Diagnostic Microbiology,** 10th Ed., C.V. Mosby Co., St. Louis, 1998.
28. Gales, A.C. and Sader, H.S. **Sistemas automatizados de hemocultura: avaliação crítica.** Documento PEM 1998/7, LEMC/UNIFESP, 1998.
29. Gardner, H.L. and Dukes, C.D. **Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified "nospecific" vaginitis.** Am J Obstet Gynecol, 69:962-976, 1955.
30. Garner, J.S., Jarvis, W.M. and Emorii, T.G. **CDC definitions for nosocomial infections.** Ann J Infect Control 16:128-140, 1988.
31. Graham, J.C. and Galloway A. **The laboratory diagnosis of urinary tract infection.** J Clin Pathol, 54:911-919, 2001.
32. Gruson, D., Hilbert, G., Valentino, R., and Vargas, F. **Utility of fiberoptic bronchoscopy in neutropenic patients admitted to intensive care unit with pulmonary infiltrates.** Crit Care Med, 28(7):2224-2230, 2000.
33. Guerrant, R.L. and Bobak, D.A. **Bacterial and protozoal gastroenteritis.** N Engl J Med, 40:325-327, 1991.
34. Guerrant, R.L., Gilder, T.V. and Steiner, T.S. **Practice guidelines for management of infectious diarrhea.** Clin Infect Dis, 32:331-351, 2001.
35. Guidoni, M.G. e Toporovski, J. **Tratamento da infecção do trato urinário na infância** In: Recomendações - Atualização de Condutas em Pediatria. Nr. 3. Sociedade de Pediatria de São Paulo, 2002.
36. Harris, J.C., Dupont, H.L. and Hornick, R.B. **Fecal leukocytes in diarrheal illness.** Ann Intern Med, 76:697-703, 1972.
37. Hayner, C.E. and Baughman, R.P. **Nosocomial Pneumonia: a review of diagnostic approaches.** Infect Med, 12(7):322-330, 1995.
38. Holmberg, S.D. **Vibrios and Aeromonas.** Infect Dis Clin North Am, 02:655-677, 1988.
39. Hooton, T.M. and Stamm, W.E. **Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infections.** Infect Dis Clin North Am, 11:551-581, 1997.
40. Hooton, T.M., Scholes and D., Stapleton, A.E. **A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women.** N Engl J Med, 343:992-997, 2000.
41. Isenberg, H.D. **Clinical microbiology procedures handbook,** American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998
42. Isenberg, H.D. **Essential procedures for clinical microbiology,** American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998.
43. Jacobs, J.A., De Brauwier, E.I.G.B., Cornelissen, E.I.M. and Drent, M. **Accuracy and precision of quantitative calibrated loops in transfer of bronchoalveolar lavage fluid.** J Clin Microbiol 38(6):2117-2121, 2000.
44. Jourdain, B., Novara, A., and Jolu-Guillou, M.L. **Role of quantitative cultures of endotracheal aspirates in the diagnosis of nosocomial pneumonia.** Am J Resp Crit Care Med, 52:241-246, 1995.
45. Kass, E.H. **Assintomatic infections of the urinary tract.** Trans Ass Am Phys, 69:56-63, 1956.

46. Koneman, W.E., Allen, D.S., Janda, M.W., Schreckenberger C.P. and Winn Jr., C.W. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th Ed., Lippincott, Philadelphia, 1997.
47. Lew D.P. and Waldvogel, G. **Osteomyelitis**. *N Engl J Med*, 336(14):999-10505, 1997.
48. Lipsky, B.A. **Prostatitis and urinary tract infection in men: what's new; what's true?** *Am J Med*, 106: 327-334, 1999.
49. Mahon, C.R. and Manuselis Jr., G. **Urinary Tract Infection**. *Diagnostic Microbiology*, W.B Saunders Company, Philadelphia, 1995
50. Maki, D.G., Weise, C.E. and Sarafin, H.W. **A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter related infection**. *N Engl J Med*, 296:1305-1309, 1977.
51. Mandell G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. **Principles and practices of infectious diseases**, 5th Ed., Churchill Livingstone, New York, 2000.
52. Marangoni, D.N., Soares, C.R. e Moreira, B.M. **Infecções do trato urinário** In: Doenças infecciosas conduta diagnóstica e terapêutica. Schechter M., Marangoni, D.V (eds), 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 425-455, 1998.
53. Marco, F.V.C., Camargo, L.F.A. and Barbas, C.S.V. **Comparison between quantitative and qualitative culture of tracheal aspirates in the diagnosis of ventilator associated pneumonia**. 21st Intern Symp on Intensive Care and Emerg Med, Poster 46, 2001, Belgium.
54. Mcintosh, K. **Community-acquired pneumonia in children**. *N Engl J Med*, 346(6):429-437, 2002.
55. Meduri, G.C. **Diagnosis and differential diagnosis of ventilatorassociated pneumonia**. *Clin Chest Med*, 16(1):61-93, 1995.
56. Miller, J.M. **A guide to specimen management in clinical microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1996.
57. Mimica, I., Donoso, E., Howard, J.E. and Ledermann, G.W. **Lung Puncture in the Etiological Diagnosis of Pneumonia**. *Am J Dis Child*, 122, 1971.
58. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, F.C. and Tenover R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6th Ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1999.
59. Murray, P.R., Washington, J.A. **Microscopy and bacteriological analysis of expectorated sputum**. *Mayo Clin Proc*, 50:339-334, 1975.
60. NNIS. **National Nosocomial Infections Surveillance**. *MMWR*, 49, 8, March 3, 2000.
61. Pruitt Jr., B.A., Mc Manus, A.T., Kim, S.H. and Goodwin, C.W. **Burn wound infections: current status**. *World J Surg*, 22:135-145, 1998.
62. Ratnam, S., Hogan, K., March, S.B. and R.W., Butler. **Whirlpool-associated folliculitis caused by Pseudomonas aeruginosa: report of an outbreak: a review**. *J Clin Microbiol*, 23:655-659, 1986.
63. Reimer, L.G., Wilson, M.L. and Weinstein, M.P. **Update on detection of bacteremia and fungemia**. *Clin Microbiol Rev*, 10(3):444-465, 1997.
64. Reller, R.B., Murray, P.R. and MacLowry, J.D. **Blood Culture II**. CUMITECH 1A. Coord. Ed. J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
65. Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H. and Gaynes, R.P. **Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States**. *Crit Care Med*, 27(5):887-892, 1999.
66. Rolston, K.V.I. **The spectrum of pulmonary infections in cancer patients**. *Curr Opin Onc*, 13:218-23, 2001.
67. Rushton, H.G. **Urinary tract infections in children**. *Pediatr Clin North Am*, 44:1133, 1997.
68. Schryver, A. and Meheus, A. **Epidemiology of sexually transmitted diseases: a global picture**. *Bull WHO*, 68:639-654, 1990.
69. Shulman, S.T., Phair, J.P., Peterson, L.R. and Warren, J.R. **The biological and clinical basis of infectious diseases**, 5th Ed., Saunders, Philadelphia, 1997.
70. Siegman-Igra, Y., Anglim, A.M. Shapiro, D.E., Adal K.A., Strain, B.A. and Farr, B.M. **Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis**. *J Clin Microbiol*, 35:928-936, 1997.
71. Sobel, J.D. **Vaginitis: current concepts**. *N Engl J Med*, 337:1896-1903, 1997.

72. Spiegel, C. A., Amsel, R. and Holmes, K.K. **Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram-stain of vaginal fluid.** J Clin Microbiol, 18:170-177, 1983.
73. Spiegel, C.A. **Bacterial vaginosis: changes in laboratory practice.** Clin Microbiol Newsl, 21:33-37, 1999.
74. Stamm, W.E. **Measurement of piuria and its relation to bacteriuria.** Am J Med, 75(Suppl. 1B):53-58, 1983.
75. Stamm, W.E. and Hooton, T.M. **Management of urinary tract infections in adults.** N Engl J Med, 329(18):1328-334, 1993.
76. Thayer, J.D. and Martin Jr., J.E. **A selective medium for the cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*.** Public Health Rep, 79:49-57, 1964.
77. Wallach, J.B. **Interpretation of Diagnostic tests.** 7th Ed, Lippincott, PA, 737-739, 2000.
78. Warford, D.A., Cherneski, M. and Peterson, E.M. **Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections.** CUMITECH 19A. Coord. Ed. C.A. Gleaves, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1999.
79. Wiblin, R.T. **Nosocomial Pneumonia** In: Hospital Infection Control. Wenzel (ed.), 807-819, 1997

Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica

Módulo II

ÍNDICE

1. Regulamento Técnico para laboratórios Clínicos.....	1
Consulta Pública nº 50, de 05 de agosto de 2004.....	1
D.O.U de 06/08/2004	1
Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 302, de 13 de Outubro de 2005.....	1
Anexo - Regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos.....	2
Histórico	2
Objetivo	2
Abrangência	2
Definições.....	2
Condições gerais.....	5
Processos operacionais	8
Registros	11
Garantia da qualidade.....	12
Controle da qualidade.....	12
Disposições transitórias.....	13
Referências normativas e bibliográficas	13
2. Requisitos básicos para laboratório de MICROBIOLOGIA.....	16
Introdução	16
Infra-Estrutura Física	16
Biossegurança e controle de Qualidade.....	17
3. classificação dos laboratórios segundo o nível de biossegurança	19
Nível 1 de Biossegurança (NB-1) ou proteção básica (P1).....	19
Nível 2 de Biossegurança (NB-2) ou (P2)	19
Nível 3 de Biossegurança (NB-3) ou (P3)	19
Nível 4 de Biossegurança (NB-4) ou (P4)	20
Classificação do organismo segundo seu potencial patogênico.....	20
Classificação dos Organismos Geneticamente Modificados	21
4. Laboratórios NB-1, NB-2 e NB-3	22
Design e infra-estrutura laboratoriais	22
Acesso	23
Equipamentos e acessórios laboratoriais	23
Gestão de segurança	25
Saúde Ocupacional	26
Áreas de trabalho.....	27
Proteção Pessoal	27
Segurança nos procedimentos laboratoriais.....	28
Descontaminação e descarte de resíduos	30
MEDIDAS RELATIVAS À ACIDENTE e derramamento.....	31
5. Precauções quanto à contaminação	32
Cuidados relativos aos riscos de contaminação biológica	32
Cuidados relativos aos riscos de contaminação química.....	33
6. Controle de qualidade no laboratório	35
Introdução	35
Objetivo	35
Ensaio de Proficiência.....	35
Parâmetros do controle de qualidade.....	35
Controle de qualidade de Equipamentos	36
Controle de qualidade de meio de cultura, REAGENTES e kits comerciais	38
Controle de Qualidade de Funcionários	40
7. Referências Bibliográficas.....	41

1. REGULAMENTO TÉCNICO PARA LABORATÓRIOS CLÍNICOS

CONSULTA PÚBLICA Nº 50, DE 05 DE AGOSTO DE 2004. D.O.U DE 06/08/2004

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o § 1º do art. 111 do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 3 de agosto de 2004, adota a seguinte Consulta Pública e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aberto, a contar da data de publicação desta Consulta Pública, o prazo de 60 (sessenta) dias para que sejam apresentadas críticas e sugestões relativas à minuta de Resolução, que define o Regulamento Técnico para fixar os requisitos mínimos exigidos para o Funcionamento dos Laboratórios Clínicos, em anexo.

Art. 2º Informar que o texto da proposta de Resolução de que trata o artigo 1º estará disponível na íntegra, durante o período de consulta, no endereço eletrônico www.anvisa.gov.br e que as sugestões deverão ser encaminhadas por escrito para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – GGES/GTOSS - SEPN 515, Bloco "B" Ed. Omega, 4º andar, Asa Norte, Brasília-DF, CEP 70.770.502, ou E-mail: gtoss@anvisa.gov.br.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art 1º a Agência Nacional de Vigilância Sanitária articular-se-á com os Órgãos e Entidades envolvidos e aqueles que tenham manifestado interesse na matéria, para que indiquem representantes nas discussões posteriores, visando a consolidação do texto final.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº. 302, DE 13 DE OUTUBRO DE 2005.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art.11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o § 1º do art.111 do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº. 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 10 de outubro de 2005;

considerando as disposições constitucionais e a Lei Federal nº. 8080 de 19 de setembro de 1990 que trata das condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, como direito fundamental do ser humano;

considerando a necessidade de normalização do funcionamento do Laboratório Clínico e Posto de Coleta Laboratorial;

considerando a relevância da qualidade dos exames laboratoriais para apoio ao diagnóstico eficaz, adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente substituto, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico para funcionamento dos serviços que realizam atividades laboratoriais, tais como Laboratório Clínico, e Posto de Coleta Laboratorial, em anexo.

Art. 2º Estabelecer que a construção, reforma ou adaptação na estrutura física do laboratório clínico e posto de coleta laboratorial deve ser precedida de aprovação do projeto junto à autoridade sanitária local em conformidade com a RDC/ANVISA nº. 50, de 21 de fevereiro de 2002, e RDC/ANVISA nº. 189, de 18 de julho de 2003 suas atualizações ou instrumento legal que venha a substituí-las.

Art. 3º As Secretarias de Saúde Estaduais, Municipais e do Distrito Federal devem implementar os procedimentos para adoção do Regulamento Técnico estabelecido por esta RDC, podendo adotar normas de caráter suplementar, com a finalidade de adequá-lo às especificidades locais.

Art. 4º O descumprimento das determinações deste Regulamento Técnico constitui infração de natureza sanitária sujeitando o infrator a processo e penalidades previstas na Lei nº. 6437, de 20 de agosto de 1977, suas atualizações, ou instrumento legal que venha a substituí-la, sem prejuízo das responsabilidades penal e civil cabíveis.

Art. 5º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

FRANKLIN RUBINSTEIN

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO PARA FUNCIONAMENTO DE LABORATÓRIOS CLÍNICOS

1 HISTÓRICO

O Regulamento Técnico de Funcionamento do Laboratório Clínico foi elaborado a partir de trabalho conjunto de técnicos da ANVISA, com o Grupo de Trabalho instituído pela Portaria nº. 864, de 30 de setembro 2003. Este Grupo de Trabalho foi composto por técnicos da ANVISA, Secretaria de Atenção a Saúde (SAS/MS), Secretaria de Vigilância a Saúde (SVS/MS), Vigilâncias Sanitárias Estaduais, Laboratório de Saúde Pública, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Provedores de Ensaio de Proficiência e um Consultor Técnico com experiência na área.

A proposta de Regulamento Técnico elaborada pelo Grupo de Trabalho foi publicada como Consulta Pública nº. 50 em 6 agosto de 2004 e ficou aberta para receber sugestões por um prazo de 60 (sessenta) dias, os quais foram prorrogados por mais 30 (trinta) dias.

As sugestões recebidas foram consolidadas pelos técnicos da Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde - GGTES/ANVISA, pelos componentes do Grupo de Trabalho juntamente com o Consultor. Após discussões, as sugestões pertinentes foram incorporadas ao texto do Regulamento Técnico, sendo produzido o documento final consensual sobre o assunto.

O presente documento é o resultado das discussões que definiram os requisitos necessários ao funcionamento do Laboratório Clínico e Posto de Coleta Laboratorial.

2 OBJETIVO

Definir os requisitos para o funcionamento dos laboratórios clínicos e postos de coleta laboratorial públicos ou privados que realizam atividades na área de análises clínicas, patologia clínica e citologia.

3 ABRANGÊNCIA

Esta Resolução de Diretoria Colegiada é aplicável a todos os serviços públicos ou privados, que realizam atividades laboratoriais na área de análises clínicas, patologia clínica e citologia.

4 DEFINIÇÕES

4.1 Alvará sanitário/Licença de funcionamento/Licença sanitária: Documento expedido pelo órgão sanitário competente Estadual, Municipal ou do Distrito Federal, que libera o funcionamento dos estabelecimentos que exerçam atividades sob regime de vigilância sanitária.

4.2 Amostra do paciente: Parte do material biológico de origem humana utilizada para análises laboratoriais.

4.3 Amostra laboratorial com restrição: Amostra do paciente fora das especificações, mas que ainda pode ser utilizada para algumas análises laboratoriais.

4.4 Amostra controle: Material usado com a finalidade principal de monitorar a estabilidade e a reprodutibilidade de um sistema analítico nas condições de uso na rotina.

4.5 Analito: Componente ou constituinte de material biológico ou amostra de paciente, passível de pesquisa ou análise por meio de sistema analítico de laboratório clínico.

4.6 Biossegurança: Condição de segurança alcançada por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e o meio ambiente.

4.7 Calibração: Conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a correspondência entre valores indicados por um instrumento, sistema de medição ou material de referência, e os valores correspondentes estabelecidos por padrões.

4.8 Coleta laboratorial domiciliar: Realização da coleta de amostra de paciente em sua residência.

4.9 Coleta laboratorial em empresa: Realização da coleta de amostra de paciente no âmbito de uma empresa.

4.10 Coleta laboratorial em unidade móvel: Realização da coleta de amostra de paciente em unidade móvel.

4.11 Controle da qualidade: Técnicas e atividades operacionais utilizadas para monitorar o cumprimento dos requisitos da qualidade especificados.

4.12 Controle externo da qualidade - CEQ: Atividade de avaliação do desempenho de sistemas analíticos através de ensaios de proficiência, análise de padrões certificados e comparações interlaboratoriais. Também chamada Avaliação Externa da Qualidade.

4.13 Controle interno da qualidade - CIQ: Procedimentos conduzidos em associação com o exame de amostras de pacientes para avaliar se o sistema analítico está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos.

4.14 Desinfecção: Processo físico ou químico que destrói ou inativa a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos.

4.15 Ensaio de proficiência: Determinação do desempenho analítico por meio de comparações interlaboratoriais conduzidas por provedores de ensaio de proficiência.

4.16 Equipamento laboratorial: Designação genérica para um dispositivo empregado pelo laboratório clínico como parte integrante do processo de realização de análises laboratoriais.

4.17 Esterilização: Processo físico ou químico que destrói todas as formas de vida microbiana, ou seja, bactérias nas formas vegetativas e esporuladas, fungos e vírus.

4.18 Fase pré-analítica: Fase que se inicia com a solicitação da análise, passando pela obtenção da amostra e finda ao se iniciar a análise propriamente dita.

4.19 Fase analítica: Conjunto de operações, com descrição específica, utilizada na realização das análises de acordo com determinado método.

4.20 Fase pós-analítica: Fase que se inicia após a obtenção de resultados válidos das análises e finda com a emissão do laudo, para a interpretação pelo solicitante.

4.21 Garantia da qualidade: Conjunto de atividades planejadas, sistematizadas e implementadas com o objetivo de cumprir os requisitos da qualidade especificados.

4.22 Inspeção sanitária: Conjunto de procedimentos técnicos e administrativos, de competência da autoridade sanitária local, que previnem e controlam o risco sanitário em estabelecimentos sujeitos a este controle.

- 4.23 Instrução escrita: Toda e qualquer forma escrita de documentar as atividades realizadas pelo estabelecimento e ou serviço.
- 4.24 Instrumento laboratorial: Designação genérica para dispositivos empregados pelo laboratório clínico que auxiliam na execução de uma tarefa analítica.
- 4.25 Insumo: Designação genérica do conjunto dos meios ou materiais utilizados em um processo para geração de um produto ou serviço.
- 4.26 Laboratório clínico: Serviço destinado à análise de amostras de paciente, com a finalidade de oferecer apoio ao diagnóstico e terapêutico, compreendendo as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.
- 4.27 Laboratório de apoio: Laboratório clínico que realiza análises em amostras enviadas por outros laboratórios clínicos.
- 4.28 Laudo laboratorial: Documento que contém os resultados das análises laboratoriais, validados e autorizados pelo responsável técnico do laboratório ou seu substituto.
- 4.29 Limpeza: Processo sistemático e contínuo para a manutenção do asseio ou, quando necessário, para a retirada de sujidade de uma superfície.
- 4.30 Material biológico humano: Tecido ou fluido constituinte do organismo humano.
- 4.31 Metodologia própria em laboratório clínico (in house): Reagentes ou sistemas analíticos produzidos e validados pelo próprio laboratório clínico, exclusivamente para uso próprio, em pesquisa ou em apoio diagnóstico.
- 4.32 Paciente de laboratório: Pessoa da qual é coletado o material ou amostra biológica para ser submetida à análise laboratorial.
- 4.33 Posto de coleta laboratorial: Serviço vinculado a um laboratório clínico, que realiza atividade laboratorial, mas não executa a fase analítica dos processos operacionais, exceto os exames presenciais, cuja realização ocorre no ato da coleta.
- 4.34 Produto para diagnóstico de uso in vitro: Reagentes, padrões, calibradores, controles, materiais, artigos e instrumentos, junto com as instruções para seu uso, que contribuem para realizar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa de uma amostra biológica e que não estejam destinados a cumprir função anatômica, física ou terapêutica alguma, que não sejam ingeridos, injetados ou inoculados em seres humanos e que são utilizados unicamente para provar informação sobre amostras obtidas do organismo humano.
- 4.35 Profissional legalmente habilitado: Profissional com formação superior inscrito no respectivo Conselho de Classe, com suas competências atribuídas por Lei.
- 4.36 Rastreabilidade: Capacidade de recuperação do histórico, da aplicação ou da localização daquilo que está sendo considerado, por meio de identificações registradas.
- 4.37 Responsável Técnico - RT: Profissional legalmente habilitado que assume perante a Vigilância Sanitária a Responsabilidade Técnica do laboratório clínico ou do posto de coleta laboratorial.
- 4.38 Saneante: Substância ou preparação destinada à higienização, desinfecção, esterilização ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos, públicos e privados, em lugares de uso comum e no tratamento da água.

4.39 Supervisão: Atividade realizada com a finalidade de verificar o cumprimento das especificações estabelecidas nos processos operacionais.

4.40 Teste Laboratorial Remoto-TLR: Teste realizado por meio de um equipamento laboratorial situado fisicamente fora da área de um laboratório clínico. Também chamado Teste Laboratorial Portátil -TLP, do inglês Point-of-care testing -POCT.

4.41 Validação: Procedimento que fornece evidências de que um sistema apresenta desempenho dentro das especificações da qualidade, de maneira a fornecer resultados válidos.

4.42 Verificação da calibração: Ato de demonstrar que um equipamento de medição apresenta desempenho dentro dos limites de aceitabilidade, em situação de uso.

5 CONDIÇÕES GERAIS

51 Organização

51.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem possuir alvará atualizado, expedido pelo órgão sanitário competente.

51.2 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem possuir um profissional legalmente habilitado como responsável técnico.

5.1.2.1 O profissional legalmente habilitado pode assumir, perante a vigilância sanitária, a responsabilidade técnica por no máximo: 02 (dois) laboratórios clínicos ou 02 (dois) postos de coleta laboratorial ou 01 (um) laboratório clínico e 01 (um) posto de coleta laboratorial.

51.2.2 Em caso de impedimento do responsável técnico, o laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem contar com um profissional legalmente habilitado para substituí-lo.

51.3 Todo laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial, público e privado devem estar inscritos no Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde - CNES.

5.1.4 A direção e o responsável técnico do laboratório clínico e do posto de coleta laboratorial têm a responsabilidade de planejar, implementar e garantir a qualidade dos processos, incluindo:

- a) a equipe técnica e os recursos necessários para o desempenho de suas atribuições;
- b) a proteção das informações confidenciais dos pacientes;
- c) a supervisão do pessoal técnico por profissional de nível superior legalmente habilitado durante o seu período de funcionamento;
- d) os equipamentos, reagentes, insumos e produtos utilizados para diagnóstico de uso "in vitro", em conformidade com a legislação vigente;
- e) a utilização de técnicas conforme recomendações do fabricante (equipamentos e produtos) ou com base científica comprovada;
- f) a rastreabilidade de todos os seus processos.

5.1.5 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem dispor de instruções escritas e atualizadas das rotinas técnicas implantadas.

5.1.6 O posto de coleta laboratorial deve possuir vínculo com apenas um laboratório clínico.

5.1.6.1 Os postos de coleta laboratorial localizados em unidades públicas de saúde devem ter seu vínculo definido formalmente pelo gestor local.

5.1.7 O laboratório clínico deve possuir estrutura organizacional documentada.

5.1.8 As atividades de coleta domiciliar, em empresa ou em unidade móvel devem estar vinculadas a um laboratório clínico e devem seguir os requisitos aplicáveis definidos neste Regulamento Técnico.

5.2. Recursos Humanos

5.2.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem manter disponíveis registros de formação e qualificação de seus profissionais compatíveis com as funções desempenhadas.

5.2.2 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem promover treinamento e educação permanente aos seus funcionários mantendo disponíveis os registros dos mesmos.

5.2.3 Todos os profissionais do laboratório clínico e do posto de coleta laboratorial devem ser vacinados em conformidade com a legislação vigente.

5.2.4 A admissão de funcionários deve ser precedida de exames médicos em conformidade com o PCMSO da NR-7 da Portaria MTE nº 3214 de 08/06/1978 e Lei nº 6514 de 22/12/1977, suas atualizações ou outro instrumento legal que venha substituí-la.

5.3 Infra-Estrutura

5.3.1 A infra-estrutura física do laboratório clínico e do posto de coleta devem atender aos requisitos da RDC/ANVISA nº. 50 de 21/02/2002, suas atualizações, ou outro instrumento legal que venha substituí-la.

5.4 Equipamentos e Instrumentos Laboratoriais

5.4.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem:

a) possuir equipamentos e instrumentos de acordo com a complexidade do serviço e necessários ao atendimento de sua demanda;

b) manter instruções escritas referentes a equipamento ou instrumento, as quais podem ser substituídas ou complementadas por manuais do fabricante em língua portuguesa;

c) realizar e manter registros das manutenções preventivas e corretivas;

d) verificar ou calibrar os instrumentos a intervalos regulares, em conformidade com o uso, mantendo os registros dos mesmos;

e) verificar a calibração de equipamentos de medição mantendo registro das mesmas.

5.4.2 Os equipamentos e instrumentos utilizados, nacionais e importados, devem estar regularizados junto a ANVISA/MS, de acordo com a legislação vigente.

5.4.3 Os equipamentos que necessitam funcionar com temperatura controlada devem possuir registro da verificação da mesma.

5.5 Produtos para diagnóstico de uso in vitro

5.5.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem registrar a aquisição dos produtos para diagnóstico de uso in vitro, reagentes e insumos, de forma a garantir a rastreabilidade.

5.5.2 Os produtos para diagnóstico de uso in vitro, reagentes e insumos adquiridos devem estar regularizados junto a ANVISA/MS de acordo com a legislação vigente.

5.5.3 O reagente ou insumo preparado ou alíquotado pelo próprio laboratório deve ser identificado com rótulo contendo: nome, concentração, número do lote (se aplicável), data de preparação, identificação de quem preparou (quando aplicável), data de validade, condições de armazenamento, além de informações referentes a riscos potenciais.

5.5.3.1 Devem ser mantidos registros dos processos de preparo e do controle da qualidade dos reagentes e insumos preparados.

5.5.4 A utilização dos reagentes e insumos deve respeitar as recomendações de uso do fabricante, condições de preservação, armazenamento e os prazos de validade, não sendo permitida a sua revalidação depois de expirada a validade.

5.5.5 O laboratório clínico que utilizar metodologias próprias - In House, deve documentá-las incluindo, no mínimo:

- a) descrição das etapas do processo;
- b) especificação e sistemática de aprovação de insumos, reagentes e equipamentos e instrumentos.
- c) sistemática de validação.

5.5.5.1 O laboratório clínico deve manter registro de todo o processo e especificar no laudo que o teste é preparado e validado pelo próprio laboratório.

5.6 Descarte de Resíduos e Rejeitos

5.6.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem implantar o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) atendendo aos requisitos da RDC/ANVISA nº 306 de 07/12/2004, suas atualizações, ou outro instrumento legal que venha substituí-la.

5.7 Biossegurança

5.7.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem manter atualizados e disponibilizar, a todos os funcionários, instruções escritas de biossegurança, contemplando no mínimo os seguintes itens:

- a) normas e condutas de segurança biológica, química, física, ocupacional e ambiental;
- b) instruções de uso para os equipamentos de proteção individual (EPI) e de proteção coletiva (EPC);
- c) procedimentos em caso de acidentes;
- d) manuseio e transporte de material e amostra biológica.

5.7.2 O Responsável Técnico pelo laboratório clínico e pelo posto de coleta laboratorial deve documentar o nível de biossegurança dos ambientes e/ou áreas, baseado nos procedimentos realizados, equipamentos e microorganismos envolvidos, adotando as medidas de segurança compatíveis.

5.8 Limpeza, Desinfecção e Esterilização

5.8.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem possuir instruções de limpeza, desinfecção e esterilização, quando aplicável, das superfícies, instalações, equipamentos, artigos e materiais.

5.8.2 Os saneantes e os produtos usados nos processos de limpeza e desinfecção devem ser utilizados segundo as especificações do fabricante e estarem regularizados junto a ANVISA/MS, de acordo com a legislação vigente.

6 PROCESSOS OPERACIONAIS

6.1 Fase pré-analítica

6.1.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem disponibilizar ao paciente ou responsável, instruções escritas e ou verbais, em linguagem acessível, orientando sobre o preparo e coleta de amostras tendo como objetivo o entendimento do paciente.

6.1.2 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem solicitar ao paciente documento que comprove a sua identificação para o cadastro.

6.1.2.1 Para pacientes em atendimento de urgência ou submetidos a regime de internação, a comprovação dos dados de identificação também poderá ser obtida no prontuário médico.

6.1.3 Os critérios de aceitação e rejeição de amostras, assim como a realização de exames em amostras com restrições devem estar definidos em instruções escritas.

6.1.4 O cadastro do paciente deve incluir as seguintes informações:

- a) número de registro de identificação do paciente gerado pelo laboratório;
- b) nome do paciente;
- c) idade, sexo e procedência do paciente;
- d) telefone e/ou endereço do paciente, quando aplicável;
- e) nome e contato do responsável em caso de menor de idade ou incapacitado;
- f) nome do solicitante;
- g) data e hora do atendimento;
- h) horário da coleta, quando aplicável;
- i) exames solicitados e tipo de amostra;
- j) quando necessário: informações adicionais, em conformidade com o exame (medicamento em uso, dados do ciclo menstrual, indicação/observação clínica, dentre outros de relevância);
- k) data prevista para a entrega do laudo;
- l) indicação de urgência, quando aplicável.

6.1.5 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem fornecer ao paciente ambulatorial ou ao seu responsável, um comprovante de atendimento com: número de registro, nome do paciente, data do atendimento, data prevista de entrega do laudo, relação de exames solicitados e dados para contato com o laboratório.

6.1.6. O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem dispor de meios que permitam a rastreabilidade da hora do recebimento e/ou coleta da amostra.

6.1.7 A amostra deve ser identificada no momento da coleta ou da sua entrega quando coletada pelo paciente.

6.1.7.1 Deve ser identificado o nome do funcionário que efetuou a coleta ou que recebeu a amostra de forma a garantir a rastreabilidade.

6.1.8 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem dispor de instruções escritas que orientem o recebimento, coleta e identificação de amostra.

6.1.9 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem possuir instruções escritas para o transporte da amostra de paciente, estabelecendo prazo, condições de temperatura e padrão técnico para garantir a sua integridade e estabilidade.

6.1.10 A amostra de paciente deve ser transportada e preservada em recipiente isotérmico, quando requerido, higienizável, impermeável, garantindo a sua estabilidade desde a coleta até a realização do exame, identificado com a simbologia de risco biológico, com os dizeres "Espécimes para Diagnóstico" e com nome do laboratório responsável pelo envio.

6.1.11 O transporte da amostra de paciente, em áreas comuns a outros serviços ou de circulação de pessoas, deve ser feito em condições de segurança conforme item 5.7.

6.1.12 Quando da terceirização do transporte da amostra, deve existir contrato formal obedecendo aos critérios estabelecidos neste Regulamento.

6.1.13 Quando da importação ou exportação de "Espécimes para Diagnóstico", devem ser seguidas a RDC/ANVISA nº 01, de 06 de dezembro de 2002 e a Portaria MS nº 1985, de 25 de outubro de 2001, suas atualizações ou outro instrumento legal que venha substituí-las.

6.2. Fase Analítica

6.2.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem dispor de instruções escritas, disponíveis e atualizadas para todos os processos analíticos, podendo ser utilizadas as instruções do fabricante.

6.2.2 O processo analítico deve ser o referenciado nas instruções de uso do fabricante, em referências bibliográficas ou em pesquisa cientificamente válida conduzida pelo laboratório.

6.2.3 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem disponibilizar por escrito, uma relação que identifique os exames realizados no local, em outras unidades do próprio laboratório e os que são terceirizados.

6.2.4 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem definir mecanismos que possibilitem a agilização da liberação dos resultados em situações de urgência.

6.2.5 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem definir limites de risco, valores críticos ou de alerta, para os analitos com resultado que necessita tomada imediata de decisão.

6.2.5.1 O laboratório e o posto de coleta laboratorial devem definir o fluxo de comunicação ao médico, responsável ou paciente quando houver necessidade de decisão imediata.

6.2.6 O laboratório clínico deve monitorar a fase analítica por meio de controle interno e externo da qualidade.

6.2.7 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem definir o grau de pureza da água reagente utilizada nas suas análises, a forma de obtenção, o controle da qualidade.

6.2.8 O laboratório clínico pode contar com laboratórios de apoio para realização de exames.

6.2.8.1 O laboratório de apoio deve seguir o estabelecido neste regulamento técnico.

6.2.9 O laboratório clínico deve:

- a) manter um cadastro atualizado dos laboratórios de apoio;
- b) possuir contrato formal de prestação destes serviços;
- c) avaliar a qualidade dos serviços prestados pelo laboratório de apoio.

6.2.10 O laudo emitido pelo laboratório de apoio deve estar disponível e arquivado pelo prazo de 5 (cinco) anos.

6.2.11 Os serviços que realizam testes laboratoriais para detecção de anticorpos anti-HIV devem seguir, o disposto neste Regulamento Técnico, além do disposto na Portaria MS nº. 59 de 28 de janeiro de 2003 e na Portaria SVS nº. 34 de 28 de julho de 2005, suas atualizações ou outro instrumento legal que venha substituí-la.

6.2.12 Os resultados laboratoriais que indiquem suspeita de doença de notificação compulsória devem ser notificados conforme o estabelecido no Decreto no 49.974-A, de 21 de janeiro de 1961, e na Portaria no 2325, de 08 de dezembro de 2003, suas atualizações, ou outro instrumento legal que venha a substituí-la.

6.2.13 A execução dos Testes Laboratoriais Remotos - TLR (Point-of-care) e de testes rápidos, deve estar vinculada a um laboratório clínico, posto de coleta ou serviço de saúde pública ambulatorial ou hospitalar.

6.2.14 O Responsável Técnico pelo laboratório clínico é responsável por todos os TLR realizados dentro da instituição, ou em qualquer local, incluindo, entre outros, atendimentos em hospital-dia, domicílios e coleta laboratorial em unidade móvel.

6.2.15 A relação dos TLR que o laboratório clínico executa deve estar disponível para a autoridade sanitária local.

6.2.15.1 O laboratório clínico deve disponibilizar nos locais de realização de TLR procedimentos documentados orientando com relação às suas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, incluindo:

- a) sistemática de registro e liberação de resultados provisórios;
- b) procedimento para resultados potencialmente críticos;
- c) sistemática de revisão de resultados e liberação de laudos por profissional habilitado.

6.2.15.2 A realização de TRL e dos testes rápidos está condicionada a emissão de laudos que determine suas limitações diagnósticas e demais indicações estabelecidos no item 6.3.

6.2.15.3 O laboratório clínico deve manter registros dos controles da qualidade, bem como procedimentos para a realização dos mesmos.

6.2.15.4 O laboratório clínico deve promover e manter registros de seu processo de educação permanente para os usuários dos equipamentos de TLR.

6.3 Fase pós-analítica

6.3.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem possuir instruções escritas para emissão de laudos, que contemplem as situações de rotina, plantões e urgências.

6.3.2 O laudo deve ser legível, sem rasuras de transcrição, escrito em língua portuguesa, datado e assinado por profissional de nível superior legalmente habilitado.

6.3.3 O laudo deve conter no mínimo os seguintes itens:

- a) identificação do laboratório;
- b) endereço e telefone do laboratório;
- c) identificação do Responsável Técnico (RT);
- d) nº. de registro do RT no respectivo conselho de classe profissional;
- e) identificação do profissional que liberou o exame;
- f) nº. registro do profissional que liberou o exame no respectivo conselho de classe do profissional
- g) nº. de registro do Laboratório Clínico no respectivo conselho de classe profissional;
- h) nome e registro de identificação do cliente no laboratório;
- i) data da coleta da amostra;
- j) data de emissão do laudo;
- k) nome do exame, tipo de amostra e método analítico;
- l) resultado do exame e unidade de medição;
- m) valores de referência, limitações técnicas da metodologia e dados para interpretação;
- n) observações pertinentes.

6.3.4 Quando for aceita amostra de paciente com restrição, esta condição deve constar no laudo.

6.3.5 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial que optarem pela transcrição do laudo emitido pelo laboratório de apoio, devem garantir a fidedignidade do mesmo, sem alterações que possam comprometer a interpretação clínica.

6.3.6 O responsável pela liberação do laudo pode adicionar comentários de interpretação ao texto do laboratório de apoio, considerando o estado do paciente e o contexto global dos exames do mesmo.

6.3.7 O laudo de análise do diagnóstico sorológico de Anticorpos Anti-HIV deve estar de acordo com a Portaria MS nº 59/2003, suas atualizações ou outro instrumento legal que venha a substituí-la.

6.3.8 As cópias dos laudos de análise bem como dados brutos devem ser arquivados pelo prazo de 5 (cinco) anos, facilmente recuperáveis e de forma a garantir a sua rastreabilidade.

6.3.8.1 Caso haja necessidade de retificação em qualquer dado constante do laudo já emitido, a mesma dever ser feita em um novo laudo onde fica clara a retificação realizada.

7 REGISTROS

7.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem garantir a recuperação e disponibilidade de seus registros críticos, de modo a permitir a rastreabilidade do laudo liberado.

7.2 As alterações feitas nos registros críticos devem conter data, nome ou assinatura legível do responsável pela alteração, preservando o dado original.

8 GARANTIA DA QUALIDADE

8.1 O laboratório clínico deve assegurar a confiabilidade dos serviços laboratoriais prestados, por meio de, no mínimo:

- a) controle interno da qualidade;
- b) controle externo da qualidade (ensaios de proficiência).

9 CONTROLE DA QUALIDADE

9.1 Os programas de Controle Interno da Qualidade (CIQ) e Controle Externo da Qualidade (CEQ) devem ser documentados, contemplando:

- a) lista de analitos;
- b) forma de controle e frequência de utilização;
- c) limites e critérios de aceitabilidade para os resultados dos controles;
- d) avaliação e registro dos resultados dos controles.

9.2 Controle Interno da Qualidade - CIQ

9.2.1 O laboratório clínico deve realizar Controle Interno da Qualidade contemplando:

- a) monitoramento do processo analítico pela análise das amostras controle, com registro dos resultados obtidos e análise dos dados;
- b) definição dos critérios de aceitação dos resultados por tipo de analito e de acordo com a metodologia utilizada;
- c) liberação ou rejeição das análises após avaliação dos resultados das amostras controle.

9.2.2 Para o CIQ, o laboratório clínico deve utilizar amostras controle comerciais, regularizados junto a ANVISA/MS de acordo com a legislação vigente.

9.2.2.1 Formas alternativas descritas na literatura podem ser utilizadas desde que permitam a avaliação da precisão do sistema analítico.

9.2.3 O laboratório clínico deve registrar as ações adotadas decorrentes de rejeições de resultados de amostras controle.

9.2.4 As amostras controle devem ser analisadas da mesma forma que amostras dos pacientes.

9.3 Controle Externo da Qualidade - CEQ

9.3.1 O laboratório clínico deve participar de Ensaios de Proficiência para todos os exames realizados na sua rotina.

9.3.1.1 Para os exames não contemplados por programas de Ensaios de Proficiência, o laboratório clínico deve adotar formas alternativas de Controle Externo da Qualidade descritas em literatura científica.

9.3.2 A participação em Ensaios de Proficiência deve ser individual para cada unidade do laboratório clínico que realiza as análises.

9.3.3 A normalização sobre o funcionamento dos Provedores de Ensaios de Proficiência será definida em resolução específica, desta ANVISA .

9.3.4 O laboratório clínico deve registrar os resultados do Controle Externo da Qualidade, inadequações, investigação de causas e ações tomadas para os resultados rejeitados ou nos quais a proficiência não foi obtida.

9.3.5 As amostras controle devem ser analisadas da mesma forma que as amostras dos pacientes.

10 DISPOSIÇÕES TRANSITÓRIAS

10.1 O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial têm o prazo de 180 (cento e oitenta) dias para se adequarem ao estabelecido neste Regulamento Técnico a partir da data de sua publicação.

11 REFERÊNCIAS NORMATIVAS E BIBLIOGRÁFICAS

11.1 BRASIL. Presidência da República. Decreto nº. 49.974-A, de 21 de janeiro de 1961. Regulamenta, sob a denominação de Código Nacional de Saúde, a Lei nº. 2.321, de 3 de setembro de 1954, de "Normas Gerais sobre Defesa e Proteção da Saúde". Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 6 fev.1961.

11.2 BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº. 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 set. 1976.

11.3 BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº. 6437 de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 ago. 1977.

11.4 BRASIL. Congresso Nacional. Lei n 8078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, v. 128, n. 176, supl. p. 1, 12 de set. 1990.

11.5 BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. 2ª edição. Brasília, Centro de Documentação. 1994

http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/processamento_artigos.pdf

11.6 BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Conduta - Exposição Ocupacional a Material Biológico: Hepatite e HIV / Coordenação Nacional de DST e AIDS - Brasília: Ministério da Saúde 1999. 20p.

http://dtr2001.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_condutas_hepatite_hiv.pdf

11.7 BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia. 4ª edição. Brasília. 2000.

<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pub22.htm>

11.8 BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Subsecretaria de Assuntos Administrativos. Vocabulário da Saúde em Qualidade e Melhoria da Gestão / Secretaria Executiva, Subsecretaria de Assuntos Administrativos; elaboração de Jeová Dias Martins. -Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 98 p. (Série F. Comunicação e Educação em Saúde).

11.9 BRASIL. Ministério da Saúde. Glossário do Ministério da Saúde: projeto terminologia em saúde / Ministério da Saúde - Brasília. Ministério da Saúde, 2004.

11.10 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 8, de 23 de janeiro de 1996. Dispõe sobre o registro de produtos para diagnóstico de uso in vitro na Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 jan. 1996.

11.11 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 1985, de 25 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico MERCOSUL para Transporte no MERCOSUL de Substâncias Infecciosas e Amostras para Diagnóstico, no MERCOSUL que consta como Anexo e faz parte da presente Portaria. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 06 nov. 2001.

11.12. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 1.943, de 18 de outubro de 2001 Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 out. 2001.

11.13 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 787, de 23 de outubro de 2002 - parte 1. Manual de Apoio aos Gestores do SUS - Organização da Rede de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 out. 2002.

11.14 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 788, de 23 de outubro de 2002. Manual de Apoio aos Gestores do Sistema Único de Saúde - SUS para a Organização dos Postos de Coleta da Rede de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 out. 2002.

11.15 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 59, de 28 de janeiro de 2003. Dispõe sobre a sub-rede de laboratórios do Programa Nacional de DST e Aids. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, Edição Extra, 30 jan. 2003.

11.16 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº.34 de 28 de julho de 2005 Regulamenta o uso de testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, Edição de 29 jul. 2005.

11.17 BRASIL. Ministério do Trabalho. Gabinete do Ministro. Portaria nº. 3.214, de 08 de junho de 1978. Dispõe sobre a Aprovação das Normas Regulamentadoras -NR- do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 06 jul. 1978.

11.18 BRASIL. Ministério do Trabalho. Portaria nº. 8, de 08 de maio de 1996- NR 07. Altera Norma Regulamentadora NR-7- Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, v. 134, nº. 91, p. 8202, 13 mai. 1996.

11.19 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 24 out. 2001.

11.20 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. Brasília, 20 mar. 2002.

12.20 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 260, de 23 de setembro de 2002. Regula os produtos para a saúde. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 03 out. 2002.

11.21 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 01, de 06 dezembro de 2002. Aprovar, conforme Anexo, o Regulamento Técnico para fins de vigilância sanitária de mercadorias importadas. Retificação - Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2003 - Prorrogada pela Resolução RDC nº. 20, de 30 de janeiro de 2003.

11.22 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 33, de 25 de fevereiro de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 05 mar. 2003.

11.23 IATA - Dangerous Good Regulations (DGR) 44^a. Edicion, 2003.

11.24 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Gestão da qualidade no laboratório clínico - NBR 14500 - jun 2000.

11.25 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Glossário de termos para uso no laboratório clínico e no diagnóstico in vitro - NBR - 14501 - mar 2001.

11.26 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Diagnóstico in vitro - Recomendações e critérios para aquisição, recepção, transporte e armazenamento de produtos - NBR 14711 - jun 2001.

11.27 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Laboratório Clínico - NBR 14785 - dez de 2001.

11.28 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Laboratório Clínico - Requisitos de segurança - NBR 14785 - dez 2001.

11.29 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline for the Safe Transport of Infectious Substances and Diagnostic Specimens, Who/EMC/97.3. [online]. Available from World Wide Web: http://www.who.int/emc/pdfs/emc97_3.pdf

2. REQUISITOS BÁSICOS PARA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

INTRODUÇÃO

- Elaborar e viabilizar normas para coleta, conservação e transporte de material de interesse clínico;
- Estabelecer e executar rotinas microbiológicas, dentro dos padrões técnico-científicos vigentes, que permitam o isolamento e identificação dos principais agentes infecciosos de importância clínica, por gênero e, se possível, por espécie;
- Determinar a sensibilidade às drogas antimicrobianas;
- Efetuar o controle de qualidade de suas atividades e dos processos de esterilização;
- Divulgar e implementar normas de biossegurança;
- Participar junto com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do rastreamento epidemiológico dos surtos de infecção hospitalar;
- Fornecer periodicamente dados relacionados com a etiologia das infecções hospitalares e da resistência às drogas;
- Executar outras atividades afins de natureza não rotineira e de relevância em determinadas situações como, por exemplo, estudos microbiológicos de materiais inanimados, portadores, desinfetantes, etc.

INFRA-ESTRUTURA FÍSICA

RECURSOS MATERIAIS

O equipamento mínimo para funcionamento de um laboratório de microbiologia consiste em:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| ▪ estufa bacteriológica | ▪ destilador para água |
| ▪ forno de Pasteur | ▪ balança para tarar tubos |
| ▪ autoclave | ▪ balança comum com uma ou duas casas decimais |
| ▪ microscópio binocular | ▪ bico de Bunsen |
| ▪ centrifugador de baixa rotação | ▪ geladeira |
| ▪ homogeneizador | ▪ capela de fluxo laminar |
| ▪ banho-maria de pequena dimensão | |

Além desse equipamento mínimo, o laboratório poderá contar com outros aparelhos opcionais:

- microscópio estereoscópico
- congelador (-20°C ou -70°C)
- bomba de vácuo para filtração com membranas
- potenciômetro
- balança analítica

RECURSOS HUMANOS

É recomendável que a supervisão técnico-científica do laboratório esteja a cargo de médico ou profissional de nível superior, especializado em microbiologia, e, se possível, em tempo integral.

BIOSSEGURANÇA E CONTROLE DE QUALIDADE

Nota-se que os laboratórios e hospitais são estruturas prestadoras de serviços em saúde, e portanto, estão constantemente envolvidos em manejo de riscos. Este é estabelecido para evitar e reduzir ao mínimo as possibilidades de acidentes ou práticas de alto risco que potencialmente podem causar dano tanto aos funcionários como aos pacientes. Sendo assim o manejo de risco deve garantir não somente um ambiente de trabalho seguro, mas também condições adequadas para que os pacientes possam se submeter aos procedimentos clínicos mais avançados e obter diagnósticos confiáveis.

Dessa forma o manejo de risco tem como objetivo a implantação de práticas de **segurança laboratorial** e de **controle de qualidade** dos serviços.

SEGURANÇA LABORATORIAL

Pode ser definida como sendo um conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes a estas atividades e que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

A rotina do Laboratório de Microbiologia envolve exposição tanto com material clínico e reagentes químicos como com potenciais agentes patogênicos concentrados em meio de cultura. Assim profissionais da área de saúde e outros trabalhadores que exercem suas atividades em laboratórios, estão sob risco de desenvolver doença por exposição a agentes infecciosos, produtos químicos tóxicos e inflamáveis, entre outros.

Atualmente, com a sofisticação das novas técnicas de diagnóstico, observamos profissionais de outras áreas, tais como físicos, químicos, analistas de sistemas, etc, envolvidos em atividades com exposição a agentes infecciosos e por outro lado, microbiologistas manipulando substâncias químicas ou materiais radioativos.

A responsabilidade legal pela segurança em ambientes de trabalho cabe aos administradores de hospitais e laboratórios. No entanto, os funcionários também são responsáveis pela sua adesão às técnicas microbiológicas seguras e da incorporação das normas de biossegurança ao seu trabalho diário delineadas no "**Manual de Segurança de Laboratório**".

Deve-se designar um encarregado ou uma comissão de segurança cujas atribuições incluem a redação, publicação e implementação das normas e instruções de segurança. Dentre os regulamentos de segurança inclui-se medidas de proteção pessoal; manuseio de equipamentos, amostras e materiais; e outras precauções. Os funcionários devem ser informados destas normas e instruções através de cursos e treinamentos regularmente programados. Cabe também ao encarregado/comissão de segurança juntamente com os administradores/supervisores dos hospitais e laboratórios de ajustar e corrigir falhas ou irregularidades de conduta.

CONTROLE DE QUALIDADE

Para o programa básico de controle de qualidade em microbiologia, deve-se incluir, além de uma lista de itens específicos, o senso comum, o bom julgamento e uma constante atenção aos detalhes. Para o controle de qualidade deve-se estabelecer o padrão mínimo e delinear as diversas etapas que devem ser seguidas para o controle diário e vigilância de todas as facetas do programa.

As diretrizes para o controle de qualidade devem constar em um manual, no qual estejam detalhadas práticas tais como procedimentos para monitorar o funcionamento dos equipamentos, o controle da reatividade dos meios e reagentes, os prazos de validade, os resultados de todos os testes, etc. Devem ser elaborados formulários adequados para coletar dados, de modo que qualquer anormalidade possa ser facilmente detectada. O encarregado também deve revisar todos os registros de controle e verificar que sejam anotadas todas as incidências fora do controle e as respectivas ações corretivas tomadas.

Os laboratórios devem também dispor de uma lista de inspeção para realizar avaliações pontuais dos controles de qualidade – um requerimento para credenciamento de laboratórios e/ou auditoria e fiscalização sanitária.

Procedimento Operacional Padrão (POP)

Para melhoria na qualidade dentro do laboratório recomenda-se a elaboração de POPs, ou seja, protocolos que descrevem detalhadamente cada atividade realizada no laboratório, desde a coleta até a emissão do resultado final, incluindo utilização de equipamentos, procedimentos técnicos e inclusive cuidados de biossegurança e condutas a serem adotadas em acidentes.

Os POPs têm como objetivo padronizar todas as ações para que diferentes técnicos possam compreender e executar, da mesma maneira, uma determinada tarefa, garantindo assim qualidade. Esses protocolos devem estar escritos de forma clara e completa possibilitando a compreensão e adesão de todos.

Os POPs devem estar disponíveis em local de acesso e conhecido de todos os profissionais que atuam no ambiente laboratorial, revisados e atualizados periodicamente e devem ser assinados pelo responsável do laboratório.

3. CLASSIFICAÇÃO DOS LABORATÓRIOS SEGUNDO O NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA

CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) é responsável pela maioria das atribuições relativas ao estabelecimento de normas, análise de risco, acompanhamento, emissão de certificados de qualidade em biossegurança (CQB) para o desenvolvimento de atividades em laboratório nessa área, definição do nível de biossegurança e classificação dos OGM (organismos geneticamente modificados). Também caberá à comissão emitir parecer técnico prévio conclusivo sobre a biossegurança desses organismos e seus derivados nas atividades de pesquisa e uso comercial.

As características físicas estruturais e de contenção de um laboratório determinam o tipo de microrganismo que pode ser manipulado em suas dependências.

NÍVEL 1 DE BIOSSEGURANÇA (NB-1) OU PROTEÇÃO BÁSICA (P1)

As práticas, o equipamento de segurança e o projeto das instalações são apropriados para o treinamento educacional secundário ou para o treinamento de técnicos, e de professores de técnicas laboratoriais. É adequado ao trabalho que envolva agente com o menor grau de risco para o pessoal do laboratório e para o meio ambiente. O *Bacillus subtilis*, o *Naegleria gruberi*, o vírus da hepatite canina infecciosa e organismos livres sob as Diretrizes do NIH (National Institute of Health) de DNA Recombinantes são exemplos de microorganismos que preenchem todos estes requisitos descritos acima. Muitos agentes que geralmente não estão associados a processos patológicos em homens são, entretanto, patógenos oportunos e que podem causar uma infecção em jovens, idosos e indivíduos imunossupressivos ou imunodeprimidos. As cepas de vacina que tenham passado por múltiplas passagens in vivo não deverão ser consideradas não virulentas simplesmente por serem cepas de vacinas.

O laboratório, neste caso, não está separado das demais dependências do edifício. O trabalho é conduzido, em geral, em bancada. Os equipamentos de contenção específicos não são exigidos. O pessoal de laboratório deverá ter treinamento específico nos procedimentos realizados no laboratório e deverão ser supervisionados por cientista com treinamento em microbiologia ou ciência correlata.

NÍVEL 2 DE BIOSSEGURANÇA (NB-2) OU (P2)

As práticas, os equipamentos, a planta e a construção das instalações são aplicáveis aos laboratórios clínicos, de diagnóstico, laboratórios escolas e outros laboratórios onde o trabalho é realizado com um maior espectro de agentes nativos de risco moderado presentes na comunidade e que estejam associados a uma patologia humana de gravidade variável. Com boas técnicas de microbiologia, esses agentes podem ser usados de maneira segura em atividades conduzidas sobre uma bancada aberta, uma vez que o potencial para a produção de borrifos e aerossóis é baixo. O vírus da hepatite B, o HIV, a salmonela e o *Toxoplasma* spp. são exemplos de microorganismos designados para este nível de contenção. O Nível de Biossegurança 2 é adequado para qualquer trabalho que envolva sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou linhas de células humanas primárias onde a presença de um agente infeccioso pode ser desconhecido.

- (1) O pessoal de laboratório deve ter treinamento técnico específico no manejo de agentes patogênicos e devem ser supervisionados por cientistas componentes;
- (2) O acesso ao laboratório deve ser limitado durante os procedimentos operacionais;
- (3) Determinados procedimentos nos quais exista possibilidade de formação de aerossóis infecciosos, devem ser conduzidos em cabines de segurança biológica ou outro equipamento de contenção física.

NÍVEL 3 DE BIOSSEGURANÇA (NB-3) OU (P3)

É aplicável para laboratórios clínicos, de diagnóstico, ensino e pesquisa ou de produção onde o trabalho com agentes exóticos possa causar doenças sérias ou potencialmente fatais como resultado de exposição por inalação. A equipe laboratorial deve possuir treinamento específico no manejo de

agentes patogênicos e potencialmente letais devendo ser supervisionados por competentes cientistas que possuam vasta experiência com estes agentes.

Todos os procedimentos que envolverem a manipulação de material infeccioso devem ser conduzidos dentro de cabines de segurança biológica ou outro sistema de contenção física. Os manipuladores devem usar roupas de proteção individual.

O laboratório deverá ter instalações compatíveis para o NB-3. Para alguns casos, quando não existirem as condições específicas para o NB-3, particularmente em instalações laboratoriais sem área de acesso específica, com ambientes selados ou fluxo de ar unidirecional, as atividades de rotina e operações repetitivas podem ser realizadas em laboratório com instalações NB-2, desde que acrescidas das práticas recomendadas para NB-3 e do uso de equipamentos de contenção para NB-3. Cabe ao Pesquisador Principal a decisão de implementar essas modificações, comunicando-as a CIBio e CTNBio.

NÍVEL 4 DE BIOSSEGURANÇA (NB-4) OU (P4)

As práticas, o equipamento de segurança, o planejamento e construção das dependências são aplicáveis para laboratórios clínicos, de diagnósticos, laboratório escola, de pesquisa ou de produções. Nestes locais, realiza-se o trabalho com agentes nativos ou exóticos que possuam um potencial de transmissão via respiratória e que podem causar infecções sérias e potencialmente fatais. O *Mycobacterium tuberculosis*, o vírus da encefalite de St. Louis e a *Coxiella burnetii* são exemplos de microorganismos determinados para este nível. Os riscos primários causados aos trabalhadores que lidam com estes agentes incluem a auto-inoculação, a ingestão e a exposição aos aerossóis infecciosos.

São poucos laboratórios no mundo que possuem instalações compatíveis com nível 4 de biossegurança.

CLASSIFICAÇÃO DO ORGANISMO SEGUNDO SEU POTENCIAL PATOGÊNICO

Classe de Risco 1	(baixo risco individual e baixo risco para a comunidade) - organismo que não causa doença ao homem ou animal. Ex: microrganismos usados na produção de cerveja, vinho, pão e queijo. (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Penicillium camembertii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , etc).
Classe de Risco 2	(risco individual moderado e risco limitado para a comunidade) - patógeno que causa doença ao homem ou aos animais, mas que não consiste em sério risco, a quem o manipula em condições de contenção, à comunidade, aos seres vivos e ao meio ambiente. As exposições laboratoriais podem causar infecção, mas a existência de medidas eficazes de tratamento e prevenção limita o risco. Exemplo: bactérias - <i>Clostridium tetani</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ; vírus - EBV, herpes; fungos - <i>Candida albicans</i> ; parasitas - <i>Plasmodium</i> , <i>Schistosoma</i>
Classe de Risco 3	(elevado risco individual e risco limitado para a comunidade) - patógeno que geralmente causa doenças graves ao homem ou aos animais e pode representar um sério risco a quem o manipula. Pode representar um risco se disseminado na comunidade, mas usualmente existem medidas de tratamento e de prevenção. Exemplos: bactérias - <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Brucella</i> , <i>Chlamydia psittaci</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; vírus - hepatites B e C, HTLV 1 e 2, HIV, febre amarela, dengue; fungos - <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Histoplasma</i> ; parasitas - <i>Echinococcus</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>
Classe de Risco 4	(elevado risco individual e elevado risco para a comunidade) - patógeno que representa grande ameaça para o ser humano e para aos animais, representando grande risco a quem o manipula e tendo grande poder de transmissibilidade de um indivíduo a outro. Normalmente não existem medidas preventivas e de tratamento para esses agentes. Exemplos: Vírus de febres hemorrágicas, Febre de Lassa, Machupo, Ébola, arnavírus e certos arbovírus.

CLASSIFICAÇÃO DOS ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Os OGMs são classificados em Grupo I e Grupo II, conforme o Anexo I da Lei 8.974/95. A classificação dos OGMs em Grupo I ou Grupo II considera os riscos associados à classe de risco e às características do organismo receptor ou parental.

OGM DO GRUPO I

Receptor ou parental

- não patogênico.
- isento de agentes adventícios.
- com amplo histórico documentado de utilização segura, ou com a incorporação de barreiras biológicas que, sem interferir no crescimento ótimo em reator ou fermentador, permita uma sobrevivência e multiplicação limitadas, sem efeitos negativos para o meio ambiente.

Vetor/Insero

- deve ser adequadamente caracterizado quanto a todos os aspectos, destacando-se aqueles que possam representar riscos ao homem e ao meio ambiente, e desprovido de seqüências nocivas conhecidas.
- deve ser de tamanho limitado, no que for possível, às seqüências genéticas necessárias para realizar a função projetada.
- não deve incrementar a estabilidade do organismo modificado no meio ambiente.
- deve ser escassamente mobilizável.
- não deve transmitir nenhum marcador de resistência a organismos que, de acordo com os conhecimentos disponíveis, não o adquira de forma natural.

Microorganismos geneticamente modificados

- não-patogênicos.
- que ofereçam a mesma segurança que o organismo receptor ou parental no reator ou fermentador, mas com sobrevivência e/ou multiplicação limitadas, sem efeitos negativos para o meio ambiente.

Outros microorganismos geneticamente modificados que poderiam incluir-se no Grupo I, desde que reúnam as condições estipuladas no item anterior

- microrganismos construídos inteiramente a partir de um único receptor procariótico (incluindo plasmídeos e vírus endógenos) ou de um único receptor eucariótico (incluindo cloroplastos, mitocôndrias e plasmídeos, mas excluindo os vírus).
- organismos compostos inteiramente por seqüências genéticas de diferentes espécies que troquem tais seqüências mediante processos fisiológicos conhecidos.

OGM DO GRUPO II

Todos aqueles não incluídos no grupo II, ou seja, qualquer organismo resultante de organismo receptor ou parental classificado como patogênico para o homem e animais como classe de risco 2, 3, ou 4.

Nota: Os laboratórios clínicos e de diagnósticos são geralmente classificados como Nível 2 ou 3 de Biossegurança.

4. LABORATÓRIOS NB-1, NB-2 E NB-3

DESIGN E INFRA-ESTRUTURA LABORATORIAIS

- Espaço suficiente deve ser projetado de modo a permitir a execução dos procedimentos laboratoriais de forma organizada e segura, e acesso fácil para limpeza e descontaminação.
- Paredes, tetos, pavimentos e bancadas devem ser duráveis, lisas, facilmente laváveis, impermeáveis a líquidos, resistentes ao calor moderado e aos produtos químicos e desinfetantes normalmente utilizados no laboratório; o piso deve ser antiderrapante e a exposição de tubulações deve ser evitada, quando possível.
- Nos laboratórios **NB-3**, aberturas, para manutenção de encanamentos, existentes nas paredes, tetos e pavimentos devem ser selados para facilitar a descontaminação. Dutos e espaços entre portas e esquadrias também devem permitir o selamento para facilitar a descontaminação.
- A iluminação deve ser adequada para todas as atividades.
- Espaço para o armazenamento de insumos e suprimentos deve ser adequado para uso imediato, evitando assim o aglomeramento nas bancadas e áreas de circulação; espaço adicional para estoque de insumos e suprimentos laboratoriais deve ser projetado em locais fora das áreas de trabalho.
- Locais específicos para o armazenamento e o manuseio seguro de solventes, materiais radioativos e gases comprimidos e liquefeitos devem ser proporcionados.
- Pertences pessoais dos trabalhadores devem ser mantidos em locais fora das instalações do laboratório. Os laboratórios **NB-3** devem dispor de sala para a troca de roupas.
- Cada laboratório deve possuir uma pia para lavagem das mãos, preferencialmente próxima à saída. Recomendamos a construção de pias que funcionem automaticamente ou que sejam acionadas com o pé ou com o joelho.
- As portas devem ter abertura para fora, serem corta-fogo, dotadas com visores de vidro e que se fechem automaticamente. É exigido um sistema de portas com trancas em dependências que abriguem agentes restritos. Para os laboratórios **NB-3** as portas devem ser duplas e que disponham de um sistema de intertravamento; um dispositivo para saída de emergência deve ser instalado.
- Uma autoclave deve estar disponível no interior ou próximo ao laboratório.
- Os sistemas de segurança devem atender emergências elétricas e de incêndio, e os locais que se encontram o chuveiro e lavador de olho.
- As áreas de primeiro-socorro devem estar adequadamente equipadas e de fácil acesso.
- Recomenda-se um sistema de ventilação mecânica que ofereçam uma circulação interna do ar sem recirculação; ou janelas que abrem e providas de telas de proteção contra insetos.

Para NB-3:

- O sistema de ventilação deve ser construído para permitir descontaminação de gases e que mantenha um fluxo de ar unidirecional adequado para o laboratório; o ar circulado no laboratório não deve ser reciclado para outras áreas do estabelecimento. No entanto, o ar pode ser filtrado com filtros HEPA, e então recondicionado e recirculado no próprio do laboratório. O ar de exaustão do laboratório (exceto das cabines de segurança) pode ser descartado para fora das instalações; recomenda-se que o descarte através de filtros HEPA.
- O ar exaurido das cabines de segurança biológica deve ser retirado diretamente para fora do ambiente de trabalho através do sistema de exaustão do edifício. Estas deverão estar conectadas de maneira que evitem qualquer interferência no equilíbrio do ar das cabines ou do sistema de exaustão do edifício. Quando as cabines de segurança biológica Classe III forem utilizadas, estas deverão estar conectadas diretamente ao sistema de exaustores.
- Centrífugas de fluxo contínuo ou outros equipamentos que possam produzir aerossóis deverão ser refrigeradas através de dispositivos que liberem o ar através de filtros HEPA antes de serem descarregados do laboratório. Esses sistemas HEPA deverão ser testados anualmente. Uma outra alternativa seria jogar o ar de saída das cabines para fora, em locais distantes de áreas ocupadas ou das entradas de ar.

- As linhas de vácuo deverão ser protegidas por sifões contendo desinfetantes líquidos e filtros HEPA, ou o equivalente. Os filtros deverão ser substituídos quando necessário. Uma alternativa é usar uma bomba a vácuo portátil (também adequadamente protegida com sifões e filtros).
- As janelas devem ser fechadas, lacradas e resistentes a danos físicos.
- Deve haver suprimento de boa qualidade de gás, eletricidade assim como de luz de emergência; o gerador é aconselhável para os equipamentos essenciais como estufas, cabine de segurança biológica, refrigeradores, etc. A manutenção regular e eficiente desses serviços é obrigatória.
- A água de torneira, não é própria para uso no Laboratório Clínico; deve ser providenciado um sistema adequado de suprimento de água purificada a fim de evitar interferências nos testes ou ensaios.
- Segurança contra incêndios e atos de vandalismo deve ser considerado; portanto portas e janelas apropriadas e chaves de uso restrito são fundamentais.
- Considere a construção de novos laboratórios longe de áreas públicas.
- Laboratórios **NB-3** devem estar localizados isoladamente de áreas que são abertas ao tráfego interno irrestrito; deve ser projetado de modo a impedir a entrada de insetos e outros organismos indesejáveis.
- O projeto da instalação e os procedimentos operacionais do **NB-3** devem ser documentados. Os parâmetros operacionais e das instalações deverão ser verificados quanto ao funcionamento ideal antes que o estabelecimento inicie suas atividades. As instalações deverão ser verificadas pelo menos uma vez ao ano.

ACESSO

- Para **NB-1**, o acesso ao laboratório deve ser limitado ou restrito de acordo com a definição do chefe de laboratório, quando estiver sendo realizado experimento ou trabalhos com amostras e culturas; além dessas exigências, nos laboratórios **NB-2 e NB-3**, o chefe de laboratório tem a responsabilidade de limitar o acesso; cabe ao mesmo avaliar cada situação e autorizar quem poderá entrar ou trabalhar no laboratório.
- Menores de idade não devem ser autorizadas ou permitidas dentro do laboratório.
- As pessoas que apresentarem um risco maior de contaminação ou que possam ter sérias conseqüências caso sejam contaminadas, não devem ser permitidas dentro dos laboratórios **NB-2 e NB-3** ou na sala de animais.
- **NB-2 e NB-3**: as portas devem ser mantidas fechadas e adequadamente identificadas: o símbolo de "Risco Biológico" deverá ser colocado na entrada do laboratório onde agentes etiológicos estiverem sendo utilizados. Este sinal de alerta deverá conter informações como o(s) nome(s) o(s) agente(s) manipulado(s), o nível de biossegurança, as imunizações necessárias, o nome e número do telefone do pesquisador, o tipo de equipamento de proteção individual que deverá ser usado no laboratório e os procedimentos necessários para entrar e sair do laboratório.
- É proibida a admissão de plantas e animais que não estejam relacionados ao trabalho em execução no laboratório.
- Nos laboratórios **NB-3** nenhum indivíduo deve trabalhar sozinho; no mínimo duas pessoas devem estar nas instalações do laboratório.

EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS LABORATORIAIS

O chefe de laboratório deve assegurar que os equipamentos e acessórios apropriados estejam disponíveis e que sejam utilizados adequadamente. Os equipamentos devem ser selecionados baseados nas seguintes premissas:

- Projetado para evitar ou limitar o contato do operador e o material infectante.
- Desenvolvido com materiais impermeáveis a líquidos, resistentes à corrosão e que atendem aos requerimentos estruturais.
- projetado e instalado para facilitar a operação, manutenção, limpeza e descontaminação; vidraria e outros produtos quebráveis devem ser evitados sempre que possível.

- Especificações devem ser consultadas para se certificar que o equipamento e/ou acessório possui os dispositivos de segurança.

EQUIPAMENTOS ESSENCIAIS DE SEGURANÇA

- Pipetas automáticas, bulbos de borracha ou outros disponíveis; é impróprio e arriscado pipetar com a boca.
- Cabines de segurança biológica para os laboratórios **NB-2** e **NB-3** (vide descrição)
- Alças de plástico descartáveis.
- Tubos e frascos com rosca.
- Autoclaves

Obs.: Equipamentos como autoclaves e cabines de segurança biológica devem ser certificadas; a calibração deve ser efetuada regularmente de acordo com as instruções do fabricante.

EQUIPAMENTOS DE CONTENÇÃO EXIGIDOS

Para os laboratórios **NB-1** não são exigidos equipamentos de contenção de agentes classificados no Grupo de Risco 1.

Para os laboratórios **NB-2**, devem ser utilizadas **Cabines de Segurança Biológica Classe I ou II**, conforme a classificação, ou outro dispositivo de contenção pessoal ou de contenção física sempre que:

- Sejam realizados procedimentos com elevado potencial de criação de aerossóis, como centrifugação, trituração, homogeneização, agitação vigorosa, ruptura por sonicação, abertura de recipientes contendo material onde a pressão interna possa ser diferente da pressão ambiental, inoculação intranasal em animais e em cultura de tecidos infectados.
- Altas concentrações ou grandes volumes de organismos contendo DNA/RNA recombinante. Tais materiais só poderão ser centrifugados fora de cabines de segurança se forem utilizadas centrífugas de segurança e frascos lacrados. Estes só deverão ser abertos no interior da cabine de segurança biológica.

As cabines devem ser instaladas, de forma que a variação da entrada e saída de ar da sala, não provoque alteração nos padrões de contenção de seu funcionamento. As cabines de segurança biológica devem estar localizadas longe de portas, janelas que possam ser abertas, áreas laboratoriais muito cheias e que possuam outros equipamentos potencialmente dilaceradores, de forma que sejam mantidos os parâmetros de fluxo de ar nestas cabines de segurança biológica.

Para os laboratórios **NB-3**, devem ser utilizadas **Cabines de Segurança Biológica Classe I, II ou III** conforme a classificação, ou outra combinação apropriada de dispositivos de proteção pessoal e contenção física sempre que:

- Houver manipulação de culturas e de material clínico ou ambiental, operações de desafio de animais, cultivo de tecidos ou fluidos infectados de animais em experimentação ou ovos embrionados, e necropsia de animais em experimentação. Cabine de segurança biológica classe III deve ser utilizada no caso de procedimentos de alto risco envolvendo microrganismo classificado na classe 3.

Estas cabines deverão estar localizadas distantes de passagens, portas, venezianas, almoxarifado sistemas de ventilação e áreas do laboratório que possuam um grande movimento.

Cabine de segurança biológica classe I

É uma modificação da cabine usada no laboratório químico. É uma cabine ventilada com fluxo de ar do ambiente, podendo ter a frente totalmente aberta ou com painel frontal ou painel frontal fechado com luvas de borracha. Possui duto de exaustão com filtro HEPA. Não há proteção para o experimento somente para o operador e o ambiente. Dentro da cabine são colocadas lâmpadas U.V. É recomendada para trabalho com agentes de risco biológico dos grupos 1, 2 e 3.

Cabine de segurança biológica classe II

A cabine classe II é conhecida com o nome de Cabine de Segurança Biológica de Fluxo Laminar de Ar. O Princípio fundamental é a proteção do operador, do meio ambiente e do experimento ou produto. Possui uma abertura frontal que permite o acesso a superfície de trabalho. Altura de segurança da

abertura do painel frontal é de 20 cm, podendo ter um alarme que previne contra a abertura excessiva do painel. Possui filtro HEPA.

Cabine de segurança biológica classe II A

Fluxo laminar de AR vertical com tiro frontal de ar de 75 pés/min. O ar contaminado após filtragem pelo filtro HEPA do exaustor passa ao ambiente onde a cabine está instalada (a cabine deve ter pelo menos 20 cm de afastamento do teto). Não se deve usar este tipo de cabine com substâncias tóxicas, explosivas, inflamáveis ou radioativas pela elevada percentagem de recirculação do ar (recircula 70 %). É recomendada para trabalho com agentes de risco biológico das classes 1 e 2.

Cabine de segurança biológica classe II B1

Esta cabine possui filtro. O ar que entra na cabine atravessa o filtro HEPA abaixo da área de trabalho, 30 % do ar recirculam enquanto que 70% saem através do filtro exaustor. O tiro de ar no seu interior é de 100 pés/min. Usada para agentes biológicos tratados com mínimas quantidades de produtos químicos tóxicos e traços de radionucleotídeos. É recomendada para o trabalho com agentes de risco biológico das classes 1, 2 e 3.

Cabine de segurança biológica classe II B2

É uma cabine de total esgotamento de ar. O ar entra pelo topo da cabine atravessa o pré-filtro e o filtro HEPA sobre a área de trabalho. O tiro frontal de ar no seu interior é de 100 pés/min. O ar filtrado, atravessa somente uma vez a área de trabalho. O esgotamento do ar deve ser realizado através do filtro HEPA conduzindo-o, por um duto, para o exterior. Pode ser usado para agentes biológicos tratados com produtos químicos e radionucleotídeos. É recomendada para trabalho com agentes de risco biológico das classes 1, 2 e 3.

Cabine de segurança biológica classe II B3

É igual a Cabine de Segurança Biológica Classe II. A velocidade de fluxo de ar no seu interior é de 75 a 100 pés/min. O ar é esgotado totalmente através de um filtro HEPA por um duto para o exterior. É recomendada para o trabalho com agentes de risco biológico das classes 1, 2 e 3.

Cabine de segurança biológica classe III

É uma cabine de contenção máxima. É totalmente fechada com ventilação própria, construída em aço inox à prova de escape de ar e opera com pressão negativa. O trabalho se efetua com luvas de borracha presas à cabine. Para purificar o ar contaminado são instalados 2 filtros HEPA em série ou um filtro HEPA e um incinerador. A introdução e retirada de materiais se efetuam por meio de autoclaves de porta dupla ou comporta de ar de porta dupla, recipiente de imersão com desinfetante. Pode conter todos os serviços como: refrigeradores, estufas, freezers, centrífugas, banho-maria, microscópio e sistema de manuseio de animais. NÃO PODE CONTER GÁS. Os dejetos líquidos são recolhidos em um depósito para serem descontaminados antes de serem lançados ao sistema de esgoto. Máxima proteção ao pessoal, meio ambiente e produto. É recomendada para o trabalho com agentes de risco biológico da classe 4 e material de pesquisa de DNA de alto risco.

GESTÃO DE SEGURANÇA

- O chefe de laboratório deve estabelecer políticas e procedimentos com ampla informação a todos que trabalhem no laboratório sobre o potencial de risco relacionado ao trabalho, bem como sobre os requisitos específicos para entrada e saída do laboratório e das salas onde ocorra manipulação de animais.
- Caberá ao diretor o responsável imediato do laboratório assegurar que antes que o trabalho com os organismos designados para o **NB-3** se inicie, toda a equipe do laboratório demonstre estar apto para as práticas e técnicas padrão de microbiologia e demonstrar habilidade também nas práticas e operações específicas do laboratório. Podendo estar incluído uma experiência anterior em manipulação de patógenos humanos ou culturas de células, ou um treinamento específico proporcionado por peritos em técnicas microbiológicas seguras.
- O responsável imediato pelo laboratório deve assegurar o desenvolvimento e implementação de um plano de gestão de segurança assim como um manual de operação; os procedimentos devem ser preparados de acordo com as especificidades das atividades realizadas e incorporados aos

procedimentos operacionais padrões (POP) ou a um manual de biossegurança específico do laboratório.

- O chefe de laboratório (subordinado ao diretor ou ao responsável imediato) deve assegurar o treinamento regular em segurança em laboratório.
- Todo o pessoal deve ser orientado para a necessidade de ler seguir as especificações de cada rotina de trabalho, procedimentos de biossegurança e práticas estabelecidas no Manual.
- Uma cópia do manual deve estar disponível e acessível no laboratório
- Quando necessário, deve ser providenciado um programa rotineiro de controle de insetos e roedores.
- Uma falha na contenção de organismos patogênicos pode ser resultado de acidentes causados por produtos químicos, radiação, incêndio e por mal funcionamento do sistema elétrico. Portanto é de extrema importância que se mantenha uma segurança de alto padrão nessas áreas em qualquer laboratório de microbiologia.
- O desenvolvimento, implementação e treinamento de um plano de emergência é necessário nos laboratórios **NB-2** e **NB-3**.

SAÚDE OCUPACIONAL

O administrador e/ou diretor juntamente com o chefe de laboratório é responsável em assegurar a implementação de um programa de controle médico de saúde ocupacional. As seguintes medidas são recomendadas:

- avaliação médica e subsequente tratamento; todos os registros médicos devem ser registrados.
- Imunização ou exame quanto aos agentes manipulados ou potencialmente presentes no laboratório (por exemplo, vacina contra a hepatite B ou teste cutâneo para a tuberculose).
- Exclusão de indivíduos altamente susceptíveis (P.ex. grávidas) de áreas de trabalho com alto risco biológico.
- O uso de equipamentos e acessórios de proteção pessoal assim como a adesão aos procedimentos recomendados.

NB-1

Embora os microrganismos de classe 1 não sejam patogênicos, o trabalhador deve fazer um exame médico e seu histórico médico deve ser registrado. Doenças ou acidentes laboratoriais devem ser registrados e todos os trabalhadores devem ser informados e conscientes da importância das boas práticas no laboratório de microbiologia.

NB-2

- Avaliação médica antes da contratação do trabalhador é necessária; o histórico médico deve ser registrado.
- Amostras referência de soro do pessoal do laboratório ou de outras pessoas possivelmente expostas ao risco, inclusive pessoal de limpeza e de manutenção devem ser coletada; amostras adicionais devem ser obtidas periodicamente dependendo do agente manipulado e das atividades exercidas nas das instalações laboratoriais.
- Registros de doenças e ausências devem ser mantidos pela gerência do laboratório; é de responsabilidade do trabalhador informar o chefe de laboratório de todas as ausências resultantes de problemas de saúde.
- Mulheres devem tomar conhecimento do risco que existe para o feto da exposição ocupacional a certos microrganismos como, por exemplo, o vírus da rubéola.

NB-3

Além das exigências citadas no NB-2:

- Indivíduos que são imunocomprometidos não devem ser contratados para trabalhar nas instalações do laboratório.

- Após uma avaliação clínica satisfatória, deve-se providenciar para o trabalhador uma notificação com a foto do mesmo e que descreva que este é um funcionário de um laboratório de nível 3 de biossegurança. A notificação pode incluir informações para contato, inclusive do chefe ou diretor do laboratório, médico ou encarregado da biossegurança do laboratório.
- Deve-se realizar anualmente radiografia de tórax para os funcionários que se dedicam à rotina de tuberculose (seguir as orientações do Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar)
- Os trabalhadores devem ser apropriadamente imunizados ou examinados quanto aos agentes manipulados ou potencialmente presentes no laboratório (por exemplo, vacina para hepatite B ou teste cutâneo para tuberculose); exames periódicos são recomendados.

ÁREAS DE TRABALHO

- O laboratório deve ser mantido limpo, arrumado e livre de materiais que não são pertinentes ao trabalho.
- As superfícies das bancadas devem ser desinfetadas no final do trabalho ou ao fim do dia ou sempre que ocorrer derramamento ou borrifada de material potencialmente perigoso.
- Todos os materiais, espécimes e culturas devem ser desinfetados antes do descarte ou da lavagem para a reutilização.
- É proibido comer, beber, fumar e aplicar cosméticos nas áreas de trabalho; alimentos devem ser guardados em áreas específicas para este fim, fora do laboratório.
- Avisos como “não comer”, “não beber” e “não fumar” devem ser expostos claramente nas instalações do laboratório.

PROTEÇÃO PESSOAL

- No interior do laboratório, os freqüentadores devem utilizar roupas apropriadas como aventais, gorros, máscaras etc. Antes de sair do laboratório para áreas externas (biblioteca, cantina, escritório administrativo), a roupa protetora deve ser retirada e deixada no laboratório e guardados em locais diferentemente do vestuário pessoal.
- **Avental** para proteção deve ser usado abotoados durante os procedimentos de rotina; deve ser de mangas longas e, se possível, de tecido sanfonado (tipo avental cirúrgico). **NB-3:** as roupas de proteção devem incluir aventais com uma frente inteira ou macacão, gorros e proteção pés quando apropriado; antes de ser lavada a roupa deverá ser descontaminada e deverá ser trocada depois de contaminada.
- **As máscaras cirúrgicas e protetores oculares (óculos com proteção lateral)** são obrigatórios para evitar a exposição das mucosas da boca e dos olhos e impedir o risco de inalação nos procedimentos que possam produzir aerossóis ou causar borrifamento de sangue; também devem ser usados no manuseio de material biológico e diante de fontes de radiação de ultravioleta artificial.
- **NB-3:** quando apropriado, **equipamentos respiratórios** devem ser utilizados em salas que contenham animais infectados
- Devem ser usadas **luvas** quando houver um contato direto com materiais e superfícies potencialmente infecciosas ou equipamentos contaminados. O mais adequado é usar dois pares de luvas. Essas luvas devem ser desprezadas quando estiverem contaminadas, quando o trabalho com materiais infecciosos for concluído ou quando a integridade da luva estiver comprometida. Luvas descartáveis não poderão ser lavadas, reutilizadas ou usadas para tocar superfícies “limpas” (teclado, telefones, etc.), e não devem ser usadas fora do laboratório. Alternativas como luvas de látex com talco deverão estar disponíveis.
 1. **Luva plástica** – descartável, deve ser desprezada após cada uso. Indicações: para proteção exclusiva do usuário em situações como colheita de sangue, recebimento ou entrega de material biológico, etc.
 2. **Luva doméstica** – que pode ser antiderrapante; não descartável. Seu uso é indicado para lavagem e desinfecção de materiais e superfícies. Após o uso, lavar as mãos enluvasadas com água e sabão e descontaminar as luvas em solução de hipoclorito a 0,5%, por 30 a 60 minutos.

3. **Luva cirúrgica (látex)** – de preferência descartável, mas pode ser reprocessada, embora com restrições. Indicada para uso em técnicas assépticas (para proteção do paciente e do usuário), tais como cateterização vesical, exames endoscópicos, punção para obtenção de líquor, líquido articular, líquido pleural, etc.
- **Lavar as mãos frequentemente:** Fazendo-se ou não do uso de luvas, lavar as mãos sempre que houver mudança de atividade, após a manipulação de materiais infecciosos, após a remoção das luvas, antes de saírem do laboratório e antes de comer, beber e mesmo fumar. A lavagem deve envolver mãos e antebraços, usando-se água e sabão líquido. Friccionar com álcool a 70% contendo 1% a 2% de glicerina. Outra opção é o uso de solução degermante à base de iodeto de polivinilpirrolidona (PVP-I) a 10%. Usar de preferência toalhas descartáveis.
 - Não comer e beber no local de trabalho, assim como não armazenar bebidas e comidas nas instalações do laboratório.
 - Não fumar, pois há um aumento do risco de contaminação com microrganismos potencialmente patogênicos ou com produtos químicos; risco de incêndio e inconveniência com relação aos colegas de trabalho.
 - Prender os cabelos; evitar o uso de anéis, pulseiras e o uso de roupa social de mangas compridas.
 - Não passar cosméticos nas instalações do laboratório.
 - Não manusear lentes de contato e quando utilizados, proteger com óculos de segurança. As lentes de contato absorvem certos solventes e podem ser perigosas em casos de respingo e derramamentos.
 - Não usar calçados abertos no laboratório como sandálias, chinelos.

SEGURANÇA NOS PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

- Culturas, tecidos e amostras de fluídos corpóreos ou dejetos potencialmente infecciosos devem ser colocados em um recipiente com uma tampa que evite o vazamento durante a coleta, o manuseio, o processamento, o armazenamento, o transporte ou o embarque.
- Nos laboratórios **NB-2** e **NB-3**, todas as manipulações abertas que envolvam materiais infecciosos deverão ser conduzidas no interior das cabines de segurança biológica ou de outros dispositivos de contenção física.
- Pipetagem com a boca deve ser proibido.
- Nenhum tipo de material deve ser levado à boca; etiquetas ou rótulos não devem ser lambidos.
- Material descartável (seringas, agulhas, luvas, toalhas, etc.) deve ser utilizado sempre que possível.
- Todo procedimento técnico deve ser executado minimizando a formação de aerossóis; sempre que houver uma probabilidade de formação de aerossol, o trabalho deve ser conduzido na cabine de segurança.

VIDRARIAS, SERINGAS E AGULHAS

- Todos os vidros que contenham reagentes devem ser rotulados e datados.
- O uso de agulhas e seringas deve ser limitado e elas não devem ser utilizadas como pipetadores ou qualquer outro propósito que não seja de injeção parenteral ou aspiração de fluídos de animais de laboratório e de garrafas de diafragmas.
- Extrema precaução deve ser tomada quando forem manuseadas agulhas e seringas de modo a evitar a auto-inoculação e a produção de aerossóis durante o uso e o descarte.
- Devem ser usadas somente seringas com agulha fixa ou agulha e seringa em uma unidade única descartável usada para injeção ou aspiração de materiais infecciosos. As seringas que possuem um envoltório para a agulha, ou sistemas sem agulha e outros dispositivos de segurança deverão ser utilizados quando necessários.
- Vidros quebrados não devem ser manipulados diretamente com a mão, devem ser removidos através de meios mecânicos como uma vassoura e uma pá de lixo, pinças ou fórceps. Os recipientes que contêm agulhas, equipamentos cortantes e vidros quebrados contaminados deverão passar por um processo de descontaminação antes de serem desprezados, de acordo com os regulamentos locais, estaduais ou federais.

MANUSEIO DE AMOSTRAS

- As amostras devem ser colhidas em recipientes resistentes, com vedação adequada para evitar derramamento e perdas. Todas as mostras devem ser consideradas potencialmente perigosas.
- Usar luvas descartáveis sempre que o trabalho envolver contato com material biológico.
- Se for evidenciada ruptura, escoamento ou mancha no recipiente com a amostra, transferir a maior quantidade possível da amostra para outro recipiente esterilizado e propriamente identificado.

BOAS PRÁTICAS PARA CENTRIFUGAÇÃO

- Antes de centrifugar qualquer material, os tubos, frascos ou garrafas devem ser verificados quanto à presença de rachaduras. Os amortecedores de borracha no fundo dos rotores devem ser trocados com periodicidade e qualquer fragmento de vidro que possa estar presente deve ser removido.
- Assegurar que a centrífuga esteja perfeitamente equilibrada antes do uso. Os anéis dos rotores e os suportes dos tubos para assegurar o equilíbrio de pesos devem ser verificados.
- Esperar que a centrifugação cesse por completo antes de abrir a tampa para remover o material.
- Em caso de derramamento e/ou quebra de um tubo dentro da centrífuga, o interior da centrífuga deve ser desinfetado por completo.
- Recomenda-se a desinfecção da centrífuga a cada dia de uso.

BOAS PRÁTICAS PARA DNA/RNA RECOMBINANTE

- Quando organismos contendo moléculas de DNA/RNA recombinantes estiverem sendo manipulados são exigidos requisitos especiais para a entrada de pessoal no laboratório (por exemplo, vacinação). Deve ser colocado um aviso sinalizando o risco, identificando o agente e o nome do chefe de laboratório, endereço completo e diferentes possibilidades de sua localização ou outra pessoa responsável. Todos os requisitos necessários para a entrada no laboratório devem estar assinalados na porta de entrada.
- Cuidados especiais devem ser tomados para impedir contaminação da pele com organismos contendo moléculas de DNA/RNA recombinantes; devem ser usadas luvas no manejo de animais em experimentação e sempre que houver possibilidade de contato da pele com o OGM.
- Devem ser usadas somente seringas com agulha fixa ou agulha e seringa em uma unidade única nas atividades de injeção ou aspiração de fluidos contendo moléculas de DNA/RNA recombinantes.
- Derramamentos ou acidentes que resultem em exposição a organismo contendo moléculas de DNA/RNA recombinante devem ser imediatamente notificados à CIBio e à CTNBio, com providências de avaliação médica, vigilância e tratamento, sendo mantido registro dos acidentes e das providências adotadas.

SEGURANÇA ELÉTRICA

- Todos os trabalhadores devem conhecer a localização dos interruptores principais e de circuitos. Nenhum instrumento deve ser reparado enquanto o mesmo estiver conectado à tomada.
- As saídas não devem ser sobrecarregadas; nunca utilizar tomadas de tipo múltiplo.
- Todos os equipamentos devem ser providos de fio terra
- Todas as descargas, incluindo os pequenos zumbidos, devem ser imediatamente investigadas
- Os fios de extensão devem ser utilizados apenas em concordância com conjunto de políticas e procedimentos gerais do estabelecimento.

MANUSEIO DE PRODUTOS QUÍMICOS

- Os armários e vasilhas de segurança para armazenamento devem estar localizados em áreas distantes das saídas e de fonte de calor, chamas e faíscas. A área de depósito deve ser ventilada e seu acesso limitado.

- Todos os recipientes devem estar claramente rotulados com indicação de: conteúdo, aviso de perigo, precauções especiais, data de recebimento e preparação, data de abertura para uso, data de vencimento, fabricante

DESCONTAMINAÇÃO E DESCARTE DE RESÍDUOS

- Todos os resíduos do laboratório e do biotério deverão ser descontaminados antes de serem descartados através de um método de descontaminação aprovado como, por exemplo, esterilização por calor úmido (autoclave). Os materiais que forem ser descontaminados fora do próprio laboratório deverão ser colocados em recipientes inquebráveis, à prova de vazamentos e hermeticamente fechados para serem transportados ao local desejado.
- Os materiais para a descontaminação na autoclave devem ser colocados em recipientes ou sacos plásticos apropriados e autoclaváveis.
- Um sistema de separação e identificação do material infeccioso e seus respectivos recipientes são recomendados:
 - **Não contaminado (não infeccioso)** – resíduo que pode ser reciclado, reutilizado ou descartado como lixo doméstico.
 - **Contaminado perfurocortante (infeccioso)** – resíduo como agulhas, seringas, lancetas e outros assemelhados devem ser descartados em recipientes estanques, rígidos, com tampa, e identificados com símbolo e expressão de resíduo infectante. As agulhas não devem ser entortadas, quebradas, recapeadas ou removidas da seringa após o uso. Agulhas e seringas devem ser imediatamente colocadas em recipientes resistentes à prova de perfurações, localizados convenientemente, e descontaminadas na autoclave antes do descarte. As seringas não podem ser esvaziadas para reaproveitamento; as seringas descartáveis, utilizadas com ou sem agulha devem ser depositadas nos recipientes e autoclavadas antes do descarte.
 - **Contaminado para descontaminação e reutilização** – recipientes, preferencialmente plásticos, com desinfetantes preparados diariamente, devem ser colocados em todas as áreas de trabalho. O material a ser reutilizado ou reciclado deve permanecer em contato com o desinfetante o tempo que for necessário, segundo as instruções do fabricante do produto. Após a desinfecção, o desinfetante e o material deve ser adequadamente descontaminado na autoclave. Em seguida, o desinfetante deve ser descartado e o material então lavado para a reutilização. Em nenhuma circunstância o material contaminado deve ser submetido a uma pré-lavagem.
 - **Contaminado para descarte** – resíduo deve ser descontaminado na autoclave em recipientes resistentes a vazamento antes do descarte. Após autoclavagem, este deve ser colocado em recipiente próprio para transporte, também resistente a vazamento e danos físicos, e vedado apropriadamente.
 - **Contaminado para incineração** – resíduo para descarte na incineração. A incineração de resíduo biológico deve seguir as normas estabelecidas pelas autoridades locais.

DESINFETANTES E QUÍMICOS

- O manual de segurança deve incluir quais e as finalidades dos desinfetantes a serem utilizados e as instruções de diluição recomendadas para cada desinfetante. O fabricante deve providenciar todas especificações relevantes. Hipoclorito de sódio e desinfetantes fenólicos são os mais recomendados para fins laboratoriais.
- Para casos especiais, álcool, iodo e outros oxidantes podem ser efetivos desde que comprovado que o agente a ser destruído não seja resistente ao procedimento.
- Microonda, ultravioleta e radiação ionizante não são apropriadas.

RESÍDUOS QUÍMICOS TÓXICOS

- Usar luvas de borracha, avental de borracha e óculos de proteção.
- O resíduo deve ser armazenado no local onde é gerado, em ambiente específico e arejado, acondicionado em saco plástico branco, dentro de suas próprias embalagens primárias. Para o caso da inexistência de suas embalagens, devem-se utilizar frascos de até dois litros, resistentes, com tampa rosqueada, vedante e identificado com o nome e fórmula do produto químico, símbolo e expressão de resíduo químico tóxico.

- O descarte de solventes orgânicos solúveis em água com volumes < 500 ml e de orgânicos insolúveis em água com volumes < 100 ml pode ser na pia:
 - Retirar todos os objetos da pia designada especialmente para descarte.
 - Deixar escorrer, sem respingos, uma corrente de água fria dentro da pia.
 - Verter lentamente o líquido, o mais próximo possível do ralo, sem produzir respingos.
 - Manter a corrente de água fria por vários minutos após a eliminação do líquido.
- Dependendo do volume gerado e o tempo de acondicionamento para o tratamento ou disposição final, o laboratório deve também possuir local específico para o abrigo de resíduos, fora da unidade geradora e fora da edificação do estabelecimento.

MEDIDAS RELATIVAS À ACIDENTE E DERRAMAMENTO

- Adotar manuais de primeiros socorros, acompanhados de treinamento e orientação verbal, sempre que necessário.
- Manter os equipamentos de segurança em lugar visível, de fácil acesso e à imediata disposição do acidentado. Os equipamentos são:
 1. um chuveiro de emergência, com grande fluxo de água
 2. um lavador de olhos
 3. Kit de primeiro socorros
 4. extintores de incêndio, vistoriados regularmente
 5. mantas contra fogo
- Respingos, derramamento e acidentes resultantes de uma exposição de produtos químicos e materiais infecciosos aos organismos deverão ser imediatamente notificados ao diretor do laboratório. A avaliação médica, a vigilância e o tratamento deverão ser providenciados e registros do acidente e das providências adotadas deverão ser mantidos por escrito.

DERRAMAMENTO DE PRODUTO BIOLÓGICO

- Vazamentos de materiais infecciosos deverão ser descontaminados, contidos e limpos pela equipe de profissionais especializados ou por outras pessoas adequadamente treinadas e equipadas para trabalharem com material infeccioso concentrado. Os procedimentos para remoção do vazamento deverão ser desenvolvidos.
- Em caso de exposição percutânea, recomenda-se lavagem exaustiva com água e sabão ou solução anti-séptica de degermante (PVP Iodo ou clorexidina). Após a exposição em mucosa, está recomendada a lavagem exaustiva com água ou solução fisiológica. A indicação do uso de anti-retrovirais deve ser baseada em uma avaliação criteriosa do risco de transmissão do HIV em função do tipo de acidente ocorrido e da toxicidade dessas medicações.
- De acordo com o *Manual de Condutas em Exposição Ocupacional ao Material Biológico* do Ministério da Saúde, após a exposição ao material biológico, cuidados locais com a área exposta devem ser imediatamente iniciados.

DERRAMAMENTO DE PRODUTO QUÍMICO LÍQUIDO

- Confinar o líquido derramado em área pequena o quanto possível.
- Neutralizar os ácidos com carbonato de sódio.
- Neutralizar as bases com ácido bórico a 1%.
- Para grandes quantidades de ácidos ou bases, lavar a área com jato forte e abundante de água após a neutralização.
- Em derramamento de líquidos tóxicos e inflamáveis, utilizar um absorvente para reduzir a pressão de vapor e evitar possível combustão do líquido.

5. PRECAUÇÕES QUANTO À CONTAMINAÇÃO

CUIDADOS RELATIVOS AOS RISCOS DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA

O Laboratório de Microbiologia recebe diariamente grande número de amostras de fluidos corporais e outros espécimes clínicos que são potencialmente infecciosos. Os agentes infecciosos mais perigosos, no que diz respeito ao risco de contaminação, são os vírus da hepatite e HIV, bacilos da tuberculose, salmonelas, fungos, protozoários, etc.

É difícil quantificar o risco no trabalho em laboratórios, com relação aos agentes infecciosos. Tem-se por base, porém, que o risco individual aumenta com a frequência e com os níveis de contato com o agente infeccioso. O primeiro cuidado a ser tomado no laboratório que trabalha com espécimes clínicos é com o risco de exposição à infecção.

Por outro lado, deve-se considerar que os riscos são influenciados por uma relação variável entre o agente infectante, o hospedeiro e a atividade desempenhada. Fatores aplicáveis ao agente incluem a virulência, a carga infectante, o ciclo e a toxigenicidade. Algumas das principais variáveis que influem o risco do hospedeiro são: idade, sexo, raça, gravidez, uso de antimicrobianos, imunidade (vacinação prévia), e o uso de drogas imunossupressoras.

Finalmente, a natureza da atividade laboratorial (por exemplo: diagnóstico, produção, pesquisa) pode afetar significativamente o risco pessoal devido ao tipo, quantidade e concentração dos agentes empregados, a manipulação dos agentes e a eficácia primária e secundária dos equipamentos de proteção e práticas de laboratório.

Deve-se ter conhecimento das principais vias de transmissão para a adoção de cuidados especiais. Exemplo: a hepatite A tem um período de incubação de 15-35 dias; a urina e as fezes contêm vírus e a infecção geralmente ocorre pela ingestão de alimentos e bebidas contaminadas. No que se refere à hepatite B, cujo período de incubação é de 40-120 dias, o sangue é a principal fonte de infecção e os acidentes, com perfurocortantes, a via mais importante de aquisição entre profissionais de saúde.

Como o laboratório não pode dispor de informações detalhadas de cada paciente, é ainda importante tratar **todas as amostras como sendo potencialmente infecciosas**.

Existem várias portas de entrada de microrganismos, mas, no laboratório, a via respiratória tem maior importância. Três fatores principais contribuem para isto: a facilidade com que partículas pequenas são produzidas por técnicas comuns de laboratório, o fato de muitas destas partículas serem suficientemente pequenas, não capturadas no trato respiratório superior, e a habilidade que a maioria dos patógenos tem de invadir o pulmão.

PRODUÇÃO DE AEROSSÓIS

O uso incorreto de equipamento de laboratório como pipetas, alças de inoculação, agulhas, seringas, centrífugas e homogeneizadores, pode produzir grandes quantidades de aerossóis potencialmente infectantes.

Exemplos de procedimentos que produzem aerossóis:

- destampar frascos que foram fechados com tampa de pressão.
- esvaziar seringas, eliminar o ar das seringas.
- quebrar frascos que contenham cultura de microrganismos.
- centrifugar tubos ou frascos sem tampa adequada.

Quando houver risco de contaminação por aerossóis, recomenda-se o emprego de cabines de segurança biológica (fluxo laminar), juntamente com o uso de luvas, máscaras e óculos de proteção. Nestas condições, manusear frascos e seringas envolvendo-os com gaze ou algodão, embebidos em álcool a 70% ou hipoclorito a 0,5%.

PIPETAGEM DE MATERIAL CLÍNICO

É contra-indicada a pipetagem, com a boca, de material clínico (sangue, liquor, urina, etc.) ou de suspensões bacterianas. Deve-se utilizar, sempre que possível, pipetas automáticas ou bulbos de borracha.

FLAMBAGEM DE ALÇA BACTERIOLÓGICA

A flambagem da alça bacteriológica durante a manipulação do material biológico ou na transferência de massa bacteriana (raspado de colônias) deve ser feita através de chama, que deve estar entre o manipulador e a alça. Recomenda-se esgotar a alça num frasco contendo álcool a 95% e areia. Quando se trabalha com *Mycobacterium tuberculosis* é recomendável o emprego de fenol a 0,5% ou hipoclorito a 0,5% e areia, flambando-se a alça em seguida..

DISSEMINAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS

Ao se trabalhar com fungos, particularmente os filamentosos, recomenda-se o uso de cabines biológicas apenas com proteção de vidro ou acrílico, sem fluxo de ar.

CUIDADOS RELATIVOS AOS RISCOS DE CONTAMINAÇÃO QUÍMICA

O laboratorista está diariamente em contato com produtos químicos potencialmente perigosos, cujos efeitos geralmente se apresentam logo após eventuais acidentes, que podem ocorrer por:

- **contato direto:** com a pele (quebra de recipiente, derramamento de líquidos, etc.); com a boca (durante a pipetagem); com o esôfago e o estômago (ingestão acidental);
- **inalação** de vapores e pós finos, com conseqüentes danos pulmonares; absorção (efeitos tóxicos no nível da medula óssea, dos rins e do fígado).

Não se deve pipetar diretamente com a boca produto químico irritante ou tóxico, deve-se fazer uso de buretas ou pró-pipetas de borracha.

PRODUTOS QUÍMICOS CORROSIVOS

- Utilizar material descartável (seringas, agulhas, luvas, toalhas, etc.).
- Manter no laboratório somente o suficiente para o uso. O restante deve ser armazenado em outras salas.
- Transferir materiais de estoque para o laboratório, com bastante cuidado.
- Manter os recipientes de uso em prateleiras localizadas da altura dos olhos para baixo, evitando-se riscos de queda e derramamento.
- Nas diluições, nunca se deve juntar água ao ácido concentrado. Sempre adicionar o ácido à água sob resfriamento, de preferência.
- Evitar a respiração junto de vapores de ácidos e evitar contato destes com a pele e com os olhos.
- Não pipetar diretamente com a boca.

PRODUTOS QUÍMICOS TÓXICOS

- Venenos, como cianetos e barbitúricos, devem ser mantidos trancados em armários.
- Solventes orgânicos (benzeno, tetracloreto de carbono e outros hidrocarbonetos halogenados): técnicas que usam estes solventes devem ser feitas em salas separadas e bem ventiladas ou em cabines de exaustão.
 1. Clorofórmio: não inflamável, porém não se deve permitir que seus vapores entrem em contato com fogo ou metais aquecidos, para evitar a formação do gás fosfogênio, que é tóxico.
 2. Éter e acetona: altamente inflamáveis. A conservação implica a aplicação das normas de segurança quanto ao risco de explosão.
- Gases tóxicos:
 1. Monóxido de carbono: concentrações até 1% no ar são perigosas se respiradas por uma hora ou mais. Acima de 1% podem ser fatais.

2. Dióxido de carbono (gelo-seco): concentrações perigosas podem ser atingidas em salas mal ventiladas.

PRODUTOS QUÍMICOS CARCINOGÊNICOS

Tem sido dispensada atenção cada vez maior a certas aminas aromáticas, compostos azo e nitrosos, entre os quais benzdina e codianisidina, de uso corrente em laboratórios de análises clínicas. Entre as precauções se inclui mantê-los em recipientes bem fechados, rotulados como "carcinogênicos". Evitar contato com a pele.

CLASSIFICAÇÃO DOS PRODUTOS QUÍMICOS

Inflamáveis

Classe	Ponto de Inflamabilidade	Ponto de ebulição	Exemplos
IA	4,4°C	18,3°C	Éter, acetaldeído
IB	22,7°C	37,7°C	Etanol, acetona, gasolina
IC	22,7°C	37,2°C	Álcool isopropílico, xileno

Combustíveis

Classe	Ponto de Inflamabilidade	Exemplos
II	37,7°C a 54,4°C	Etilenoglicol, ácido acético glacial
III	60°C	Anilina, glicerol, óleo mineral

6. CONTROLE DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO

INTRODUÇÃO

Um dos procedimentos mais importantes para dirigir as atividades diárias de um laboratório de microbiologia é um manual atualizado de procedimentos ou procedimento operacional padrão (POP).

Todas as atividades e respectivos protocolos devem estar claramente delineados e colocados em local acessível do laboratório para a consulta regular pelos trabalhadores.

A forma como os procedimentos devem ser desenvolvidos e implementados deve ser determinada pelo responsável imediato do laboratório.

Seguem os principais itens que devem constar no manual de procedimento:

- Nome, endereço e telefone de todos os trabalhadores do laboratório.
- Lista de todos os planos de ação e regulamentos geral do laboratório.
- Lista da localização exata dos equipamentos, meio de culturas, reagentes, e outros suplementos, incluindo descrição completa das fórmulas e instruções para o uso e preparo.
- Descrição completa de todos os formulários, informes e arquivos utilizados no laboratório de microbiologia.
- Descrição detalhada de todas as técnicas e procedimentos efetuados no laboratório
- Lista de todos os esquemas de identificação utilizados para identificar e classificar os microrganismos.
- Nome, endereço, telefone, procedimentos e planos de ação de laboratórios de referência relacionados com o envio de amostras.
- Inclusão de todos os procedimentos de controle de qualidade com detalhes específicos quanto a frequência e modo como cada item deve ser realizado.
- Para inspeção do laboratório é exigido que o manual de procedimentos seja revisto e atualizado ao menos uma vez ao ano e que constem as iniciais do diretor ou chefe de laboratório em cada procedimento, indicando que a atualização foi efetuada.

OBJETIVO

O laboratório clínico de microbiologia é responsável em providenciar informação precisa e relevante quanto ao diagnóstico do paciente. O valor e a precisão clínica das análises do material clínico e o respectivo isolamento do microrganismo são dependentes do programa de qualidade, que por sua vez, avalia a qualidade do material; documenta a validade do método aplicado; monitora a performance dos procedimentos, reagentes, meios, instrumentos e do indivíduo que executou a análise; e verifica os resultados do teste quanto aos erros e relevância clínica. Um programa de qualidade efetivo depende de um processo de avaliação contínuo e do seu aprimoramento.

ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA

O desempenho dos exames de laboratório clínico é realizado através de ensaios de proficiência. Este programa consiste na avaliação de amostras por evento. Há um número estabelecido de eventos anuais de testes em cada área de atividade: bacteriologia, micologia, parasitologia e virologia. As amostras de proficiência devem ser analisadas pelos trabalhadores que habitualmente realizam as análises em questão, de acordo com os procedimentos de rotina e juntamente com as amostras de pacientes.

O laboratório que não atender os requisitos dos ensaios de proficiência deve documentar a fonte do problema, revisar o programa em vigor e tomar medidas corretivas.

PARÂMETROS DO CONTROLE DE QUALIDADE

Parâmetros	Diretrizes
Coleta e transporte de amostra	<ul style="list-style-type: none"> - Descreve as instruções de coleta e transporte - Estabelece o critério de aceitação e rejeição das amostras
Performance dos equipamentos e instrumentos	<ul style="list-style-type: none"> - Documenta a verificação do funcionamento do equipamento e uso freqüente que assegura o funcionamento apropriado - documenta a manutenção regular - documenta os registros de manutenção do equipamento
Meios de cultura prontos	<ul style="list-style-type: none"> - Mantém o protocolo de controle de qualidade do fabricante - Obtém a garantia por escrito quanto aos padrões de embalagem, rotulagem e protocolo - Inspecciona as condições dos meios, placas de petri, hemólises, excesso de bolhas, contaminação, volume, temperatura - Documenta as falhas e as medidas corretivas, e informa o fabricante - Executa teste de CQ até a falha ser corrigida
Meios de cultura preparado no laboratório	<ul style="list-style-type: none"> - Registra a quantidade, o número do lote, método de esterilização, a data de preparo, prazo de validade, pH e nome do preparador - Avalia quanto a coloração, consistência, inclinação, hemólise, excesso de bolhas e contaminação - Executa o teste de CQ com os microrganismos de propriedades fisiológicas e bioquímicas conhecidas
Reagentes e suplementos	<ul style="list-style-type: none"> - Rotula os frascos quanto ao conteúdo, concentração, requerimentos para estoque, data de fabricação e de recebimento, prazo de validade número do lote, volume - Armazena de acordo com as recomendações do fabricante - Executa o teste de controle negativo e positivo antes do uso - Descarta aqueles que falharam na performance
Kits comerciais	<ul style="list-style-type: none"> - Testa cada lote novo ou em cada entrega - Segue as recomendações do fabricante para teste de CQ
Funcionários	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliza funcionários suficientemente qualificados para trabalho complexo e volumoso - Documenta as atividades de treinamento contínuo - Providencia aos funcionários por escrito padrões de performance - Avalia funcionários anualmente
Registro de CQ	<ul style="list-style-type: none"> - Registra todos os resultados em um formulário de CQ - Relata ao chefe e/ou responsável resultados "anormais" e as medidas de correção no formulário de CQ - Mantém os registros por pelo menos dois anos
Manual de Procedimento	<ul style="list-style-type: none"> - Define os procedimentos, limites de tolerância, aceitação da amostra, preparo do reagente, CQ, cálculos e laudos - Revisa anualmente - Aprova e data todas as mudanças - Torna disponível na área de trabalho

CONTROLE DE QUALIDADE DE EQUIPAMENTOS

Em todos os laboratórios de microbiologia deve ser estabelecido um programa de manutenção preventiva para assegurar o funcionamento apropriado de todos os equipamentos elétricos ou mecânicos.

- Os equipamentos devem ser controlados em intervalos de tempo pré-estabelecidos.

- As peças devem ser trocadas após um período específico de uso, mesmo que não pareçam alteradas.
- A manutenção pode ser executada tanto pelo fabricante como pelo setor de serviços de engenharia do laboratório, quando existente.
- Os trabalhadores do laboratório devem realizar todos os controles e registrar conforme instruídos em impressos ou manual de manutenção; isto permite a detecção imediata de desvios e portanto a adoção de medidas corretivas apropriadas antes que comprometam os resultados.
- As temperaturas dos equipamentos devem ser medidas diariamente com termômetros calibrados.
- Qualquer leitura que resulte em valores fora dos limites de tolerância definidos pelo controle de qualidade, deve-se determinar a causa e corrigir o problema.

Procedimentos para o controle de qualidade de alguns equipamentos

Equipamento	Procedimento	Intervalo	Limites de Tolerância
Refrigeradores	Registro de temperatura *	Diário ou contínuo	2°C a 8°C
Congeladores	Registro de temperatura *	Diário ou contínuo	-8°C a -20°C -60°C a -75°C
Estufas	Registro de temperatura *	Diário ou contínuo	35,5°C ± 1°C
Estufas CO ₂	Medida do conteúdo de CO ₂ : - Usar analisador de gases sanguíneos ou dispositivo Fyrite ¹	Diário ou duas vezes ao dia	5 a 10%
Banhos	Registro de temperatura *	Diário	36°C a 38°C 55°C a 57°C
Aquecedores	Registro de temperatura *	Diário	± 1°C do estabelecido
Autoclaves	Teste com tiras de esporos (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	Ao menos semanalmente	O não crescimento de esporos indica corrida estéril.
Medidor de pH	Testes com soluções para calibrar pH	A cada uso	± 0,1 unidade de pH do padrão em uso.
Jarras de anaerobiose	Tira indicadora com azul de metileno	A cada uso	A conversãp da tira de azul para branco indica baixa tensão de CO ₂ .
Câmara anaeróbia com luvas	Cultivo de <i>Clostridium novyi</i> tipo B Solução indicadora de azul de metileno	Periódico	O crescimento indica baixa tensão de O ₂ . Utilizada apenas quando é preciso uma tensão de O ₂ extremamente baixa. A solução permanece incolor se a tensão de O ₂ for baixa.
Rotador de sorologia	Contagem de rpm	A cada uso	180 rpm ± 10 rpm
Centrífugas	Controlar revoluções com tacômetro	Mensalmente	Dentro de 5% do estabelecido no indicador.
Cabines de segurança	Medir a velocidade do ar através da abertura para o rosto ²	Semestral ou trimestralmente	Fluxo de 1,52m de fluxo de ar/minuto ± 0,152 m/minuto.

* cada termômetro de controle deve ser calibrado contra um termômetro padrão.

¹- Bacharach Instrument Co, Pittsburgh, PA.

²- Velometer Jr., Alnor Instrument Co., Chicago, IL.

CONTROLE DE QUALIDADE DE MEIO DE CULTURA, REAGENTES E KITS COMERCIAIS

Embora é aceito por auditores, inspetores de laboratório os registros de qualidade documentados pelos fabricantes de meios de cultura, recomenda-se um controle de qualidade periódico desses produtos pelo laboratório.

Os microrganismos empregados para o controle de qualidade devem ser mantidos no laboratório por meio de subcultivos de isolados recuperados como parte do trabalho de rotina ou microrganismo de referência como os da ATCC.

ALGUMAS RECOMENDAÇÕES

- Cada bateria de meios deve ser controlada com os quesitos mais exigentes para o crescimento ou para a produção de atividade bioquímica. A disponibilidade de cepas do laboratório pode ser necessária para suplementar aquelas comercialmente disponíveis.
- Cada tubo de cultura, placa de meio e reagente deve ter uma etiqueta que identifique claramente o conteúdo e as datas de preparo e vencimento.
- Cada bateria de tubos e placas deve ser também controlada quanto à esterilidade, principalmente aqueles nos quais são adicionados suplementos após a esterilização. As provas de esterilidade devem ser feitas visualmente e por meio de subcultivos. Determinados meios seletivos, por exemplo, podem suprimir o crescimento visível de bactérias, mas as células viáveis podem aparecer nos subcultivos.
- Os meios preparados devem ser visualmente avaliados para sinais de deterioração como descoloração, turvação, mudança de cor e desidratação.
- Os reagentes e testes usados para identificação de micobactéria devem ser verificados uma vez ao dia, quando utilizados, com uma espécie de micobactéria que resulte uma reação positiva. Para verificação de fixação de ferro, o teste deve ser monitorado para controle negativo e positivo.
- Os reagentes e testes utilizados para identificação de fungos devem ser examinados uma vez por semana, quando utilizados, para controle positivo. O reagente nitrato que determina sua assimilação é monitorado com peptona.
- Todos os discos para susceptibilidade antimicrobiana devem estar avaliados ao menos uma vez por semana com microrganismo padrão de qualidade, de sensibilidade conhecida como *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. fecalis* (ATCC 29212) e *P. Aeruginosa* (ATCC 27853).
- Os kits comerciais devem ser examinados a cada entrega e a cada lote, conforme as recomendações do fabricante.
- Os componentes de um kit não devem ser utilizados com um kit de lote diferente, a não ser quando especificado pelo fabricante.

Atenção: A frequência das provas de controle de qualidade dos produtos comerciais utilizados no laboratório deve ser determinado pelo chefe ou responsável imediato do laboratório, conforme as instruções dos respectivos fabricantes ou referências em literatura.

Microrganismo-controle e reações para o controle de qualidade dos meios de cultura

Meio	Microrganismo	Reações
Ágar Sangue	<i>Streptococcus</i> do Grupo A <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bom crescimento, beta-hemólise Bom crescimento, alfa-hemólise
Ágar bile-esculina	Espécies de <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i> alfa-hemolítico não do grupo D	Bom crescimento, cor negra Nenhum crescimento, sem coloração do meio
Ágar chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Bom crescimento Bom crescimento
Ágar uréia de Christensen	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Toda a superfície de cor rosa (positivo) Inclinação do meio rosa (positivo parcial) Cor amarela (negativo)

Ágar citrato de Simmons	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Crescimento ou cor azul (positivo) Sem crescimento, permanece verde (negativo)
Ágar cistina-tripticase (ACT)		
- Dextrose	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Branhamella catarrhalis</i>	Cor amarela (positivo) Não modifica a cor (negativo)
- Sacarose	<i>Escherichia coli</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cor amarela (positivo) Não modifica a cor (negativo)
- Maltose	Espécies de <i>Salmonella</i> ou <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cor amarela (positivo) Não modifica a cor (negativo)
- Lactose	<i>Neisseria lactamicus</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cor amarela (positivo) Não modifica a cor (negativo)
Descarboxilases		
- Lisina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter sakasaki</i>	Cor azulada (positivo) Cor amarela (negativo)
- Arginina	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Cor azulada (positivo) Cor amarela (negativo)
- Ornitina	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cor azulada (positivo) Cor amarela (negativo)
DNase	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Zona de clarificação (adicionar HCl 1 N) Sem zona de clarificação
Ágar eosina azul-de-metileno	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Shigella flexneri</i>	Bom crescimento, brilho verde metálico Bom crescimento, púrpuras, sem brilho Bom crescimento, transparentes (lactose-negativas)
Ágar de Hecktoen	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Escherichia coli</i>	Verdes com centro negro Verdes transparentes Crescimento algo inibido, alaranjadas
Indol	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cor vermelha (positivo) Ausência de cor vermelha (negativo)
Ágar lisina-ferro	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Profundidade e inclinação púrpura + H ₂ S Inclinação púrpura/profundidade amarela Inclinação vermelha/profundidade amarela
Ágar MacConkey	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> Espécies de <i>Enterococcus</i>	Colônias vermelhas (lactose-positivas) Colônias incolores, sem disseminação Sem crescimento
Malonato	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sem crescimento Bom crescimento, cor azul (positivo)
Motilidade	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meio turvo (positivo) Sem borda plumosa em estria (negativo)
Caldo ou ágar nitrato	<i>Escherichia coli</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>	Cor vermelha ao adicionar reativos Ausência de cor vermelha (negativo)
Ágar sangue feniletíl álcool	Espécies de <i>Streptococcus</i> <i>Escherichia coli</i>	Bom crescimento Sem crescimento
o-Nitrofil-beta-D-galactopiranosídeo (ONPG)	<i>Serratia marcescens</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Cor amarela (positivo) Incolor (negativo)
Fenilalanina desaminase	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Cor verde (adicionar FeCl ₃ a 10%) Ausência de cor verde (negativo)
Ágar Salmonella-Shigella	<i>Salmonella typhimurium</i>	Colônias incolores, centro negro

	<i>Escherichia coli</i>	Sem crescimento
Voges-Proskauer	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Cor vermelha (adicionar reativos) Não desenvolve cor (negativo)
Ágar xilose-lisina-dextrose (XLD)	Espécies de <i>Salmonella</i> <i>Escherichia coli</i> Espécies de <i>Shigella</i>	Colônias vermelhas (lisina-positivas) Colônias amarelas (positiva para açúcares) Colônia transparentes (negativo)

Procedimentos adicionais quanto ao controle de qualidade estão especificadas nos dos módulos seguintes.

CONTROLE DE QUALIDADE DE FUNCIONÁRIOS

O controle de qualidade dos funcionários requer um programa de educação permanente efetivo. O treinamento deve ser prático e ser uma atividade regular. Os trabalhadores envolvidos com as atividades do laboratório devem ser estimulados a participar com freqüência em cursos, seminários e similares, tanto localmente quanto ao nível nacional.

Os resultados dos procedimentos devem ser conferidos pelo responsável designado quanto à exatidão, reprodutibilidade e concordância com os padrões de controle de qualidade.

Todos os trabalhadores envolvidos com atividades rotineiras do laboratório de microbiologia, inclusive os que exercem suas tarefas em turnos alternativos, devem ter acesso ao programa de ensaios de proficiência.

Reuniões regulares para informar os trabalhadores do laboratório quanto às mudanças e sugestões de melhorias nos procedimentos laboratoriais são recomendáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. August, M.J., Hindler, J.A., Huber, T.W., Sewel, D.L. e Cumitech A. **Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology**. Coord. Ed. A.S. Wessfeld, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1990.
2. Isenberg, H.D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
3. Ministério da Saúde. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia**. Fundação Nacional da Saúde, Brasília, 2001.
4. Ministério da Saúde. **Manual de Conduta - Exposição Ocupacional a Material Biológico: Hepatite e HIV**. Coordenação Nacional de DST e AIDS, Ministério da Saúde, Brasília, 1999.
5. Ministério da Saúde. **Manual de condutas em exposição ocupacional a material biológico**. Secretaria de Políticas de Saúde, Brasília, 1999.
6. Ministério da Saúde. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle da infecção hospitalar**. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, Brasília, 1991.
7. Ministério da Saúde. **Manual de Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde**. 2ª Edição, Centro de Documentação Brasília, 1994.
8. World Health Organization. **Laboratory biosafety manual**. 2nd. Ed., WHO, Genebra, 2003.

Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica

Módulo III

ÍNDICE

1. Requisição de Exames Microbiológicos	1
Modelos para Requisição de exames Microbiológicos	1
Exames especiais de interesse da CCIH	4
2. Coleta, Transporte e Conservação de Amostra	5
Introdução	5
Aspectos básicos da coleta e do transporte de amostra	5
Instruções para Hemoculturas	7
Instruções para Ponta de Cateter Intravascular.....	9
Instruções para Ponta de Sonda Vesical	9
Instruções para Escarro.....	10
Instruções para Secreção Traqueal.....	10
Instruções para Aspirado Transtraquial (ATT)	10
Instruções para Lavado Bronco-Alveolar (BAL).....	10
Instruções para Secreção de Orofaringe.....	11
Instruções para Fluidos Orgânicos Estéreis	11
Instruções para Feridas, Abscessos e Exsudatos.....	12
Instruções para Amostras de Tecido Subcutâneo e Amostras de Pele	12
Instruções para Biópsia da Pele	13
Instruções para Tecido Ósseo.....	13
Instruções para Lesões Superficiais - coleta para fungos - micológico direto.....	13
Instruções para Secreção de Ouvido.....	13
Instruções para Secreção Ocular.....	13
Instruções para Material Genital	14
Instruções para Secreção Anal.....	16
Instruções para Fezes	17
Instruções para Urina.....	17
Instruções para Anaeróbios.....	18
3. Microscopia e coloração	20
Direto sem Coloração	20
Coloração de GRAM	21
Outras Colorações	25
4. Semeadura em meios de cultura	28
Material Clínico e os respectivos meios de cultura e microscopia	28
Procedimentos para SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA	30
5. Identificação.....	35
Meios de cultura	35
Coloração de Gram	35
Esquema geral de identificação bacteriana	36
6. Manutenção e estoque de culturas.....	38
Manuntenção das culturas	38
Estoque de culturas Bacterianas por \geq 1 ano	39
Estoque de culturas Bacterianas por $<$ 1 ano	40
Estoque de micobactérias por \geq 1 ano	40
Estoque de micobactérias por $<$ 6 meses	41
Estoque de cultura de fungos por \geq 1 ano	41
Estoque de cultura de fungos por $<$ 6 meses	42
Coleções de cultura.....	42
7. Referências bibliográficas.....	43

1. REQUISIÇÃO DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS

Deve-se lembrar que o envolvimento do médico com o laboratório de microbiologia pode com frequência ser muito útil para ambos, propiciando melhor orientação técnica, mais objetividade, facilitando a interpretação de resultados, etc.

A importância do relacionamento médico com o laboratório deve-se ao fato de que a microbiologia envolve etapas interpretativas para muitos exames. Por exemplo, aqueles que envolvem flora (mucosas), ou no caso de agentes específicos em que são fundamentais a escolha de meios seletivos, o uso de meios enriquecedores, o uso de suplementos, a ampliação do tempo de cultivo, a variação na temperatura de incubação, a adição de novos testes, etc.

O médico muitas vezes considera um desperdício de tempo o preenchimento de uma requisição de exame microbiológico.

O microbiologista ou responsável pela rotina deverá conferir as requisições ou pedidos de exame de cada material para verificar a existência de pedido.

Os itens abaixo servem apenas de roteiro para destacar informações que podem ser muito úteis e valorizadas em diferentes etapas do processamento do exame.

- Identificação clara do paciente (**modelo 1**)
- Informações sobre o paciente que são relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso (**modelo 2**)
- Descrição da amostra (**modelo 3**)
- Natureza do Teste Solicitado (**modelo 4**)

Fatores que podem comprometer o exame microbiológico:

- Hipótese diagnóstica mal elaborada.
- Informações mal colhidas, incompletas, ou não devidamente interpretadas, etc.
- Requisição inadequada da análise laboratorial.
- Coleta, conservação e transporte inadequados.
- Falhas técnicas no processamento da análise.
- Demora na liberação de resultado.
- Má interpretação dos resultados.

MODELOS PARA REQUISIÇÃO DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS

MODELO 1

Nome _____	Sobrenome _____	Iniciais _____
Registro n.º (do hospital ou serviço) _____		
Data de nascimento ____/____/____ (evitar confusão com homônimos e com a faixa etária)		
Sexo: M () F () (por exemplo, a interpretação de bacteriúria pode ser diferente para a mulher)		
Clínica () Leito () Ambulatório ()		
Campo para identificação do exame no Laboratório (número da análise microbiológica e seção do laboratório) _____		

MODELO 2

Hipótese diagnóstica _____

Dados clínicos (descrever objetivamente os achados clínicos mais significativos, lesões cutâneas ou de mucosas, local e características do sítio de infecção, etc.) _____

Dados epidemiológicos relevantes (viagem ou excursão, se vive em área endêmica de alguma doença infecciosa como malária, riquetsioses, cólera, etc.; doença ocupacional, por exemplo, contato com animais; acidentes - mordida, trauma, picada de carrapato, enchentes, etc.; envolvimento em surto de infecção hospitalar, etc.) _____

Outros dados laboratoriais importantes (dados laboratoriais que evidenciem o sítio do processo infeccioso: RX, tomografia, urina rotina, hemograma, etc.) _____

Provável origem do processo infeccioso: comunitário () hospitalar ()

Relacionado ao procedimento invasivo? Qual? (se hospitalar e se relacionado ao procedimento invasivo - sonda vesical, cateter, traqueostomia, diálise, alimentação parenteral, cirurgia) _____

Cirurgia? Qual? _____

Existe infecção em outra topografia? Qual? _____

Fez uso nos últimos dez dias de antibióticos? Quais? (descrever os motivos do uso) _____

Existe comprometimento imunológico? Sim () Não ()
(prematuridade, transplante de órgãos, uso de imunossupressores, diabetes, câncer, aids, leucemia, anemia falciforme, talassemia, hemofilia, esplenectomia, cirrose, etc.; doença oportunista? Qual?)

É paciente transferido ou de alta de outro hospital nos últimos 30 dias? Sim () Não ()

É portador, colonizado ou infectado de bactérias multirresistentes? Sim () Não ()

Para urocultura informar: sintomático () assintomático ()

Data do pedido ____/____/____

Nome legível do médico/CRM, carimbo e/ou telefone de contato (facilita a comunicação para situações emergenciais. Por exemplo, isolamento de *M. tuberculosis*, isolamento de nova cepa multirresistente, etc)

Data ____/____/____ **hora da coleta** _____

Nome e identificação de quem colheu o material (permite reavaliação de procedimentos e reciclagem, por exemplo, quando se detecta excesso de contaminação em uroculturas, etc) _____

Observações (comentários, quando necessários, sobre o procedimento de coleta. Por exemplo, acidentes ou dificuldades para obtenção do material, condições do paciente, quantidade, etc) _____

MODELO 3

Hemocultura:	Sangue periférico ()	Sangue colhido de cateter ()	
Urocultura:	Jato médio () Punção suprapúbica ()	Sonda de alívio () Saco coletor ()	Sonda vesical de demora ()
Trato Respiratório:	Orofaringe () Lavado bronco-alveolar () Outros ()	Escarro ()	Aspirado Traqueal () Escovado brônquico ()
Lesões, secreções, abscessos ()			
Descrever topografia: _____			
Nível da coleta:	superficial ()	profunda ()	
Via de obtenção do material:	Punção () Drenagem ()	Swab () Fístula ()	Raspado () Outros () _____
Líquidos cavitários:	Líquor () Sinovial ()	Líquido pleural () Ascítico ()	Pericárdico ()
Próteses ()	Pontas de cateter ()		
Outros: _____			

MODELO 4

Exame microscópico:	A fresco () Campo escuro () Direto ()
Com coloração:	Gram () Ziehl () Giemsa () Outro ()
Pesquisa de:	<i>Pneumocistis carinii</i> () <i>Cryptosporidium</i> () <i>Isospora belli</i> ()
Cultura:	Rotina bacteriológica () Rotina para fungos () Rotina para micobactérias () Rotina para vírus ()
Específicos:	Rotina para anaeróbios () Mycoplasma () <i>Legionella</i> spp. () <i>Helicobacter</i> spp. ()
Outros testes: (em geral realizados sob consulta) _____	

EXAMES ESPECIAIS DE INTERESSE DA CCIH

- Controle de medicamentos
- Frascos de soros
- Bolsas de sangue
- Portadores
- Equipamentos
- Outros

TESTES ESPECIAIS

- Aglutinação com látex para meningite.
- Testes imunológicos diretamente no material clínico: *Chlamydia trachomatis* (genital), *Streptococcus pyogenes* (orofaringe).
- Pesquisa de toxinas (*S. aureus*, *Limulus* teste para endotoxinas de Gram (-) *Clostridium difficile* etc.)
- Tipagem para fins epidemiológicos em investigação de surtos ou fontes de infecção hospitalar.
- PCR (polimerase chain reaction) para micobactérias, etc.
- Exames quantitativos (exceto os de rotina, como urina, cateter vascular e lavado broncoalveolar). Por exemplo, hemocultura de sangue periférico ou de cateter, biópsia de tecidos, líquido de diálise peritoneal, etc.

TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

- Rotina (Kirby – Baner).
- Antibiograma com drogas não padronizadas.
- Outros testes - Concentração Inibitória Mínima (CIM), E-test.
- Pesquisa de antimicrobianos no sangue, LCR, etc., poder bactericida do soro.
- Teste de sensibilidade de fungos a drogas, etc.

2. COLETA, TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRA

INTRODUÇÃO

Todo resultado liberado pelo laboratório de microbiologia é consequência da qualidade da amostra recebida. O material coletado deve ser representativo do processo infeccioso investigado, devendo ser eleito o melhor sítio da lesão, evitando contaminação com as áreas adjacentes.

A coleta e o transporte inadequados podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o desenvolvimento da flora contaminante, induzindo a um tratamento não apropriado. Portanto, procedimentos adequados de coleta devem ser adotados para evitar o isolamento de um "falso" agente etiológico, resultando numa orientação terapêutica inadequada.

O profissional responsável pela coleta será também responsável por identificar de forma legível e correta o material a ser encaminhado ao laboratório de microbiologia.

Na amostra devem estar identificados:

- Nome e registro do paciente
- Leito ou ambulatório e especialidade
- Material colhido
- Data, hora e quem realizou a coleta

ASPECTOS BÁSICOS DA COLETA E DO TRANSPORTE DE AMOSTRA

COLETA

Quem coleta o material deve ser devidamente treinado e periodicamente reciclado nesta atividade. Deve saber que o material deverá ser destinado, o mais brevemente possível, ao laboratório. Deve conhecer ou obter instruções sobre conservação e/ou transporte do material caso este não possa ser realizado imediatamente.

Considerações gerais da coleta microbiológica

- Colher antes da antibioticoterapia, sempre que possível.
- Instruir claramente o paciente sobre o procedimento.
- Observar a anti-sepsia na coleta de todos os materiais clínicos.
- Colher do local onde o microrganismo suspeito tenha maior probabilidade de ser isolado.
- Considerar o estágio da doença na escolha do material. Patógenos entéricos causadores de diarreia, estão presentes em maior quantidade e são mais facilmente isolados durante a fase aguda ou diarreica do processo infeccioso intestinal. Na suspeita de febre tifóide, a fase da doença irá determinar o melhor local da coleta (sangue/fezes).
- Quantidade suficiente de material deve ser coletado para permitir uma completa análise microbiológica. Caso a quantidade seja pequena, priorizar os exames.
- pedido do exame deve conter as informações descritas no módulo anterior (ver requisição de exame).

Considerações de segurança

- Utilizar as barreiras de proteção necessárias a cada procedimento.
- Toda amostra deve ser tratada como potencialmente patogênica.
- Usar frascos e meios de transporte apropriados.
- Não manusear a amostra em trânsito: paciente e laboratório.

- Não contaminar a superfície externa do frasco de coleta e verificar se ele está firmemente vedado. **(caso ocorram respingos ou contaminação na parte externa do frasco, fazer descontaminação com álcool 70% ou outra solução descontaminante disponível)**
- Não contaminar a requisição médica que acompanha o material.
- As amostras deverão ser transportadas em sacos plásticos fechados.
- Identificar claramente a amostra coletada, com todos os dados necessários.
- Colocar a identificação no frasco de coleta e nunca na tampa ou sobre rótulos.
- Encaminhar os materiais imediatamente ao laboratório.

TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Transportar as amostras **IMEDIATAMENTE** ao laboratório para:

- Assegurar a sobrevivência e isolamento do microrganismo, pois o laboratório de microbiologia trabalha basicamente em função da viabilidade dos microrganismos.
- Evitar o contato prolongado dos microrganismos com anestésicos utilizados durante a coleta, pois eles poderão exercer atividade bactericida.
- Evitar erros de interpretação nas culturas quantitativas, principalmente urina e lavado broncoalveolar.
- Consultar o laboratório para verificar a disponibilidade dos meios de transporte.

Tempo crítico para entrega da amostra ao laboratório e meios de transporte

Amostra	Tempo Crítico	Frascos e Meios de Transporte
Liquor	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril
Líquido pleural	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril
Swab	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril ou meio semi-solido (Stuart, Amies)
Suspeita de anaeróbios	30 minutos	Meio de transporte apropriado Evitar o transporte em seringa com agulha
Feridas e tecidos	30 minutos de ou até 12 horas (meio de transporte)	Meio de transporte apropriado
Hemocultura	30 minutos (não refrigerar)	Frascos com meios de cultura para rotina manual ou automatizada
Trato respiratório	30 minutos	Tubo seco estéril
Trato gastrointestinal	1 hora	Tubo seco estéril
Urina	1 hora ou refrigerada até 24 horas	Pote seco estéril
Fezes	12 horas se em meio de transporte	Cary Blair meio modificado para transporte de fezes, com pH 8,4. Boa recuperação também para <i>Vibrio sp</i> e <i>Campylobacter sp</i>

CRITÉRIOS DE REJEIÇÃO PARA AMOSTRAS CLÍNICAS

O recebimento criterioso das amostras clínicas pelo laboratório de microbiologia garante uma melhor correlação clínico/laboratorial.

O microbiologista ou responsável pela rotina deverá verificar se a amostra está apropriadamente identificada, se a quantidade de material é suficiente e observar o aspecto da amostra - purulento, límpido, hemorrágico, etc.

Principais erros de identificação

- Discrepância entre a identificação da amostra e o pedido médico.
- Falta de identificação da amostra.
- Origem da amostra ou tipo de amostra não identificada.
- Teste a ser realizado não especificado.

Amostras Inadequadas

- Material clínico recebido em solução de fixação (formalina).
- Ponta de cateter de Foley.
- Material conservado inadequadamente com relação a temperatura (urinas colhidas há mais de 24 horas, que ficaram guardadas em geladeira, ou colhidas há mais de duas horas, sem refrigeração).
- Frascos não estéreis.
- Presença de vazamentos, frascos quebrados ou sem tampa, com contaminação na superfície externa.
- Mais de uma amostra de urina, fezes, escarro, ferida colhida no mesmo dia e da mesma origem.
- Swab único com múltiplas requisições de testes microbiológicos.
- Swab seco.
- Culturas para anaeróbios recebidas em condições não apropriadas.

Amostras com as características acima descritas são inadequadas e demandam um contato prévio com o médico solicitante para melhores esclarecimentos.

Amostras não recomendadas para o exame microbiológico por fornecerem resultados questionáveis

Amostra	Procedimento
Swab de amostra de queimadura	processar biópsia ou aspirado
Swab de úlcera de decúbito	processar biópsia ou aspirado
Swab de abscesso perirretal	processar biópsia ou aspirado
Swab de lesão de gangrena	processar biópsia ou aspirado
Swab de lesão periodontal	processar biópsia ou aspirado
Swab de úlcera varicosa	processar biópsia ou aspirado
Vômito	não processar
Material de colostomia	não processar
Ponta de cateter de Foley	não processar
Aspirado gástrico de recém-nascido	não processar

INSTRUÇÕES PARA HEMOCULTURAS

TÉCNICAS DE COLETA

- Colher antes da administração de antibióticos.
- Lavar as mãos e secá-las.
- Remover os selos da tampa dos frascos de hemocultura e fazer assepsia prévia nas tampas com álcool 70%.

- Garrotear o braço do paciente e selecionar uma veia adequada. Esta área não deverá mais ser tocada com os dedos. Fazer a anti-sepsia com álcool 70% de forma circular e de dentro para fora. Aplicar solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI 10%) também com movimentos circulares e de dentro para fora. Para ação adequada do iodo, deixar secar por um a dois minutos antes de efetuar a coleta.
- Coletar a quantidade de sangue e o número de amostras recomendados de acordo com as orientações descritas ou se discriminadas no pedido médico.
- Remover o iodo do braço do paciente com álcool 70% para evitar reação alérgica.
- Identificar cada frasco com todas as informações padronizadas e enviar ao laboratório juntamente com a solicitação médica devidamente preenchida.

Observações:

- Não é recomendada a técnica de coleta através de cateteres ou cânulas quando se podem utilizar punções venosas.
- Punções arteriais não trazem benefícios na recuperação dos microrganismos quando comparadas com punções venosas.
- Não se recomenda a troca de agulhas entre a punção de coleta e distribuição do sangue no frasco de hemocultura.
- Método de coleta do sangue e o volume coletado influenciam diretamente no sucesso de recuperação de microrganismos e uma interpretação adequada dos resultados.
- Cada instituição deverá ter suas normas de coleta particularizadas de acordo com o tipo de sistema utilizado (manual x automatizado) e do tipo de paciente.

Fatores que influenciam diretamente os resultados de hemoculturas:

Volume de sangue coletado por frasco:

O **volume** ideal corresponde a 10% do volume total do frasco de coleta. Quanto maior o **volume de sangue** inoculado no meio de cultura, por amostra, melhor recuperação do microrganismo, respeitando-se a proporção sangue/meio citada, pois o sangue em desproporção com o meio pode inibir o crescimento de microrganismos. Frascos que possibilitem uma coleta de até 10 ml são os mais indicados. Exemplo: frascos com 40 ml coletar de 4 ml a 5 ml de sangue. O anticoagulante recomendado é o SPS (Polianetolsulfonato sódico).

Método de anti-sepsia:

A execução de técnica de anti-sepsia para reduzir os riscos de contaminação de hemocultura.

IDENTIFICAÇÃO DOS FRASCOS E PEDIDO MÉDICO

- Nome do paciente
- Hora e local da coleta
- Anotar uso de antibióticos
- Possível diagnóstico

TRANSPORTE

- Nunca refrigerar o frasco.
- Manter o frasco em temperatura ambiente e encaminhar o mais rápido possível para o laboratório.

NÚMERO DE FRASCOS

- Deverá ser considerado de acordo com a condição clínica do paciente.
- Um total de três culturas em 24 horas costuma ser suficiente para descartar bacteremia ou endocardite (Coletas acima de quatro amostras não trouxeram maior índice de recuperação microbiana em diferentes trabalhos clínicos).
- Dados recentes sugerem que o número de frascos anaeróbios coletados deve ser adaptado de acordo com a patologia.

Adultos e Adolescentes

- Endocardite bacteriana aguda: coletar três amostras de punções venosas diferentes (braço direito e esquerdo), com intervalo de 15 a 30 minutos, 1 a 2 horas antes da antibioticoterapia
- Endocardite bacteriana subaguda: coletar três amostras, nas primeiras 24 horas, com intervalo mínimo de 15 minutos, com punções venosas diferentes. Colher, de preferência, as duas primeiras antes do início da febre. Se, após 24 horas de cultivo, não apresentarem crescimento bacteriano, colher mais três amostras.
- Infecções sistêmicas e localizadas como sepsis aguda, meningite, osteomielite, artrite ou pneumonia bacteriana aguda: coletar duas amostras de punções venosas diferentes, antes da antibioticoterapia, com intervalos de cinco minutos entre as punções. Se possível, 10 ml a 20 ml por amostra.
- Bacteremia de origem indeterminada: coletar quatro a seis amostras de punções venosas diferentes em 48 horas. Se, após 24 horas de cultivo, não apresentarem crescimento bacteriano, colher mais duas amostras.
- Paciente com picos febris regulares: coletar não mais que três amostras antes do início da febre (1 hora); evitar o pico febril.

Crianças

- Coletar amostras com 0,5 ml a 3 ml.
- Duas culturas são recomendadas para diagnóstico de bacteremias em recém-nascidos.

INSTRUÇÕES PARA PONTA DE CATETER INTRAVASCULAR

Cateteres intravenosos são importantes fontes de bacteremia e fungemia, bem como causadores de complicações infecciosas no local da inserção. Quando existe suspeita de colonização no cateter, com a possibilidade de evolução para septicemia, a ponta do cateter deve ser cultivada.

TÉCNICAS DE RETIRADA DA PONTA DE CATETER

Cultura semi-quantitativa (Método de Maki) da ponta de cateter é importante para determinar a relação entre colonização do cateter e sepsis. O resultado obtido, entretanto, depende de técnicas de retirada adequadas. **Deve ser salientado que os mesmos cuidados de desinfecção utilizados na introdução do cateter devem ser adotados no momento da retirada.** São eles:

- Fazer uma rigorosa anti-sepsia da pele ao redor do cateter com álcool 70%, seguida de uma solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI 10%, que deverá ser removida com álcool 70% para evitar queimadura pelo iodo ou reação alérgica).
- Remover o cateter e, assepticamente, cortar 5 cm da parte mais distal, ou seja, a que estava mais profundamente introduzida na pele. Não usar tesouras embebidas em soluções anti-sépticas.
- Colocar o pedaço do cateter num frasco estéril, sem meio de cultura. O material deve ser transportado imediatamente ao laboratório evitando sua excessiva secagem.
- A presença de um número maior ou igual a 15 colônias de um único tipo de bactéria sugere que a ponta de cateter pode estar sendo fonte de infecção.
- Cateteres aceitáveis para cultura semi-quantitativa: Central, CVP, Hickman, Broviac, periférico, arterial, umbilical, alimentação parenteral e Swan-Ganz.

INSTRUÇÕES PARA PONTA DE SONDA VESICAL

Não realizar cultura de ponta de sonda vesical, porque o crescimento bacteriano representa a flora da uretra distal. Recomenda-se cultura de urina após 48 horas da retirada da sonda na monitorização de processos infecciosos.

Uroculturas realizadas antes deste período podem fornecer resultados positivos sem que eles estejam, necessariamente, associados à infecção.

INSTRUÇÕES PARA ESCARRO

Existem ocasiões em que o paciente deve participar ativamente da coleta de material, como no caso do escarro. A melhor coleta é feita sob a supervisão direta da equipe de enfermagem ou do fisioterapeuta.

Lembrar que este material não é considerado ideal para avaliação microbiológica do trato respiratório. Hemocultura, lavado brônquico ou aspirado transtraqueal podem fornecer resultados mais confiáveis.

- Orientar o paciente da importância da coleta do escarro e não da saliva. As amostras de saliva são impróprias para análise bacteriológica, pois não representam o processo infeccioso.
- Colher somente uma amostra por dia, se possível o primeiro escarro da manhã, antes da ingestão de alimentos.
- Orientar o paciente para escovar os dentes, somente com água (não utilizar pasta dental) e enxaguar a boca várias vezes, inclusive com gargarejos.
- Respirar fundo várias vezes e tossir profundamente, recolhendo a amostra em um frasco de boca larga. Se o material obtido for escasso, coletar a amostra depois de nebulização.
- Encaminhar imediatamente ao laboratório.
- Na suspeita de infecção por micobactérias ou fungos, coletar pelo menos três amostras, em dias consecutivos (somente uma amostra por dia).
- Em caso de pacientes com dificuldades para escarrar, esta amostra poderá ser induzida por inalação ou ser realizada coleta por aspiração transtraqueal.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO TRAQUEAL

A coleta deste material é realizada em pacientes entubados, através de sonda de aspiração. Os resultados microbiológicos dessas amostras podem refletir colonização local, sendo a interpretação clínica extremamente complicada.

Como procedimento para diagnóstico etiológico de pneumonias hospitalares, não se recomenda esse procedimento, que poderá levar a condutas terapêuticas inadequadas.

INSTRUÇÕES PARA ASPIRADO TRANSTRAQUIAL (ATT)

O procedimento é realizado por equipe médica especializada. O material é obtido diretamente por material transtraqueal, evitando-se contaminação com o trato respiratório alto.

INSTRUÇÕES PARA LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (BAL)

Utilizado para obtenção etiológica das pneumonias associadas a ventilação mecânica e em paciente imunodeprimidos, sendo considerado o método mais fidedigno para investigação microbiológica do trato respiratório inferior.

Os agentes etiológicos da pneumonia estão geralmente presentes em altas concentrações nas secreções pulmonares ($>10^5$ - 10^6 UFC/ml). O valor de corte sugerido para distinguir colonização de infecção é de 10^5 UFC/ml. Este valor foi determinado por alguns estudos, podendo ocorrer variações.

O tempo do transporte da amostra é essencial, devendo estar em torno de 30 minutos, sendo o máximo aceitável de 1 a 2 horas. O material deverá ser obtido antes das biópsias de escovados para se evitar excesso de sangue.

Este procedimento deve ser realizado por equipe médica especializada:

Colher as alíquotas em recipientes distintos:

- A primeira alíquota deverá ser colocada em frasco identificado como **primeira amostra** (utilizada para esfregaços microbiológicos).
- Todas as outras amostras poderão ser coletadas em um único frasco estéril (**POOL**). Somente estas amostras deverão ser utilizadas para a cultura quantitativa, evitando falsas contagens.

CULTURA PARA ANAERÓBIOS DO TRATO RESPIRATÓRIO:

Coletar tecido pulmonar, aspirado transtraqueal, aspirado percutâneo, aspirado transcutâneo e lavado brônquico via cateter protegido.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO DE OROFARINGE

A contaminação com saliva, que contém uma flora bacteriana variada, pode dificultar o isolamento do verdadeiro agente infeccioso.

As amostras devem ser cultivadas para recuperação do *Streptococcus pyogenes*.

- Solicitar ao paciente que abra bem a boca.
- Usando abaixador de língua e swab estéril, fazer esfregaços sobre as amígdalas e faringe posterior, evitando tocar na língua e na mucosa bucal.
- Procurar o material nas áreas com hiperemia próximas aos pontos de supuração ou remover o pus ou a placa, colhendo o material abaixo da mucosa.
- Coletar a amostra exatamente na área inflamada, evitando outros sítios na cavidade oral.
- Colher dois swabs.
- Enviar imediatamente ao laboratório para evitar a excessiva secagem do material.

INSTRUÇÕES PARA FLUIDOS ORGÂNICOS ESTÉREIS

(Líquidos: Pleural, Ascítico, Biliar, de Articulações e outros)

- Proceder a anti-sepsia no sítio da punção com álcool 70% e com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI 10%), que deverá ser removida após o procedimento, com álcool de 70% para evitar queimadura ou reação alérgica.
- Obter a amostra através de punção percutânea ou cirúrgica. Quanto maior o volume da amostra, maior a probabilidade de isolamento do agente etiológico. Coleta por procedimento médico.
- Encaminhar o líquido coletado em tubo seco e estéril ou inoculado diretamente nos frascos do equipamento de automação de hemoculturas.
- Transportar imediatamente ao laboratório, com a orientação do tipo de cultura (aeróbia, anaeróbia, fungos, micobactérias, etc.) necessariamente especificada no pedido médico.

LIQUOR

Procedimento realizado por equipe médica especializada.

- Recomenda-se jejum.
- Caso a coleta permita somente a disponibilidade de um tubo, o laboratório de microbiologia deverá ser o primeiro a manipulá-lo. Caso haja coleta de dois ou mais tubos, o Laboratório de Microbiologia deverá ficar com o tubo que contiver menos sangue.
- Ao transportar a amostra, nunca refrigerar.
- Transportar a amostra imediatamente ao laboratório, acompanhada de pedido médico adequadamente preenchido, nos casos de paciente com idade crítica.
- Os exames a serem realizados devem ser especificados e priorizados de acordo com o volume coletado.

INSTRUÇÕES PARA FERIDAS, ABSCESSOS E EXSUDATOS

O termo "secreção de ferida" não é apropriado como informação da origem do material coletado. O sítio anatômico específico, bem como as informações adicionais (material de ferida superficial ou profunda), são extremamente valiosos para o laboratório, auxiliando na interpretação dos resultados.

- As margens e superfície da lesão devem ser descontaminadas com solução de povidine iodine (PVPI) e soro fisiológico (metade/metade).
- Proceder à limpeza com solução fisiológica.
- Coletar o material purulento localizado na parte mais profunda da ferida, utilizando-se, de preferência, aspirado com seringa e agulha. Quando a punção com agulha não for possível, aspirar o material somente com seringa tipo insulina.
- Swabs (menos recomendados) serão utilizados quando os procedimentos acima citados não forem possíveis. A escarificação das bordas após anti-sepsia pode produzir material seroso que é adequado para cultura.

Observações:

- A descontaminação da superfície das lesões ou abscessos abertos, antes da coleta do material, é crítica para interpretação do resultado.
- Não coletar o pus emergente. O material das margens da lesão e a parte mais profunda do sítio escolhido são mais representativos e possuem maior viabilidade de microrganismos.
- A cultura de lesões secas e crostas não é recomendada, a menos que a obtenção de exsudato não seja possível.
- A coleta de ferida de queimadura deve ser realizada após extensa limpeza e debridamento da lesão. Biópsia da pele é a técnica mais recomendada.

CULTURA PARA ANAERÓBIOS DE SECREÇÕES DE FERIDAS E ABSCESSOS

Aspirar o material com agulha e seringa após descontaminação da superfície com PVPI a 10%, deixando em contato com a superfície por um minuto. Quando o uso de agulha for contra-indicado, aspirar o material com cateter plástico flexível ou diretamente com seringa, sem agulha.

INSTRUÇÕES PARA AMOSTRAS DE TECIDO SUBCUTÂNEO E AMOSTRAS DE PELE

A superfície da ferida de queimadura estará colonizada pela microbiota do próprio paciente e/ ou pelos microrganismos do meio ambiente em que se encontra. Quando a colonização de bactérias for grande, pode ocorrer infecção subcutânea, resultando numa bacteremia. Cultura somente da superfície pode levar a erros e é desaconselhável. Portanto, biópsia de tecido profundo é o mais indicado.

Os microrganismos não ficam distribuídos somente na ferida queimada. Por isso, recomenda-se coletar amostras de áreas adjacentes da queimadura.

- Desinfetar a superfície com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI a 10%), que deverá ser removida com álcool 70% para evitar queimadura e reação alérgica. No caso de pacientes queimados usar solução aquosa de PVPI a 10% e ou solução fisiológica.
- Deixar secar antes de coletar a amostra.
- Coletar amostra de punção de biópsia (3 mm a 4 mm) para cultura.

CONSIDERAÇÕES PARA COLETA DE TECIDO SUBCUTÂNEO E AMOSTRAS DE TECIDO

Cultura	Procedimento
Bactéria	Aspirado ou amostra de biópsia são preferíveis ao invés de swab
Anaeróbio	Não é comum para queimaduras, úlceras, nódulos ou infecções superficiais da pele; usado para mordeduras e traumas

Fungo	Usada para diagnosticar dermatófitos, leveduras, filamentos e fungos dimórficos
Micobactéria	Útil no diagnóstico de <i>M. marimum</i> , <i>M. fortuitum</i> e <i>M. chelonei</i>

INSTRUÇÕES PARA BIÓPSIA DA PELE

- Descontaminar a superfície com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI a 10%), que deverá ser removida com solução fisiológica para evitar queimadura e reação alérgica.
- Procedimento médico, coletar 3 mm a 4 mm de amostra.
- Colocar num recipiente estéril, sem formalina, com meio de cultura líquido fornecido pelo laboratório.

INSTRUÇÕES PARA TECIDO ÓSSEO

- Obter amostra óssea através de biópsia ou curetagem.
- Colocar num recipiente estéril contendo NaCl 0,85% estéril (solução fisiológica).
- Não usar formalina.

INSTRUÇÕES PARA LESÕES SUPERFICIAIS - coleta para fungos - micológico direto

- Limpar a superfície com água destilada ou soro fisiológico estéreis; não utilizar iodo.
- Usando um bisturi, raspar as bordas da lesão.
- Amostra do couro cabeludo inclui cabelo, que é seletivamente coletado para exame.
- Amostra de unha - obter raspado e/ou material abaixo da unha.

Os materiais obtidos podem ser colocados em placa de Petri estéril e identificados separadamente para cada sítio a ser investigado (por exemplo, unha da mão direita, raspado do pé esquerdo, raspado da região plantar, etc.).

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO DE OUVIDO

CONDUTO AUDITIVO EXTERNO E MÉDIO (ATÉ A MEMBRANA TIMPÂNICA).

- Remover secreção superficial com um swab umedecido em salina estéril e com outro swab obter material fazendo rotação no canal.
- Inserir, em seguida, no meio de transporte (Stuart).

CONDUTO AUDITIVO INTERNO

- Membrana timpânica rompida: o médico deve proceder como no item anterior e com espéculo ou cone de otoscópio coletar material com swab e em seguida inserir no meio de transporte. Com outro swab, fazer esfregaço para coloração Gram.
- Membrana íntegra: usar seringa para puncionar a membrana ou sistema apropriado para aspiração e coletor, que deverão ser encaminhados imediatamente ao laboratório para processamento ou introduzir em meio de transporte para conservação e fazer lâmina para bacterioscopia.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO OCULAR

- As culturas deverão ser coletadas antes da aplicação de antibióticos, soluções, colírios ou outros medicamentos.
- Desprezar a secreção purulenta superficial e, com swab colher o material da parte interna da pálpebra inferior.
- Identificar corretamente a amostra e enviar imediatamente ao laboratório, evitando a excessiva secagem do material.

INSTRUÇÕES PARA MATERIAL GENITAL

AMOSTRAS E SÍTIOS GENITAIS PARA CULTURA

	Não indicados para o Cultivo de Anaeróbios	Indicados para o Cultivo de Anaeróbios
TRATO FEMININO	Endocérnix Vagina Uretra Placenta Vulva externo feminino Genital Períneo	Placenta (origem de cesárea) Endométrio Falópio de Trompa Aspirado cervical Ovário Glândulas de Bartholin
TRATO MASCULINO	Uretra Fluido prostático Fluido Seminal	

Observações:

- A seleção de materiais genitais, bem como sua coleta adequada, são fatores importantes na interpretação das culturas deste tipo de material, uma vez que estes possuem uma quantidade grande de microrganismos comensais.
- Culturas vaginais de rotina não são indicadas pelo motivo acima exposto.
- Culturas anaeróbias são limitadas a certos materiais, conforme tabela anterior.
- Muitos agentes de infecção genital em mulheres são limitados a certos sítios anatômicos, conforme tabela a seguir.
- Nos casos de suspeita de infecção por *Chlamydia trachomatis* deverá ser solicitado exame por imunofluorescência ou por biologia molecular (PCR). Pode ocorrer associação entre infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.
- Material purulento, proveniente da glândula de Bartholin, poderá ser obtido diretamente do ducto, após massagem digital ou colhida através de seringa.
- Endométrio: este tipo de material é melhor coletado por curetagem. Recomenda-se o uso de swabs protegidos para coleta via cérvix, para evitar contaminação com a flora vaginal.
- DIP (Doença Inflamatória Pélvica): o material é coletado por técnica invasiva. O líquido peritoneal pode ser coletado por aspiração do fundo de saco vaginal (culdocentese). Material retirado diretamente dos ovários ou trompas é coletado cirurgicamente.
- Vulva: raspados, aspirados ou biópsia não têm muito valor para cultura a não ser em casos de suspeita de sífilis. Nos casos de suspeita de sífilis, a lesão deverá sofrer uma abração cuidadosa com gaze seca até que um fluido seroso comece a fluir, tomando cuidado para evitar sangramento, o que acarreta interferência no exame em campo escuro. Após o acúmulo de fluido seroso, colocar uma gota em uma lâmina limpa e examinar imediatamente.
- DIU (Dispositivo Intra-Uterino): deve ser removido pelo médico evitando-se contaminação cervical ou vaginal. Coloque todo o DIU dentro de um recipiente estéril para ser transportado para o laboratório.
- Cultura semi-quantitativa para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* podem ser realizadas com kits comercializados. Consultar a bula para maiores informações. Infecções por *Chlamydia trachomatis*: não aceitar secreção vaginal para pesquisa de *Chlamydia*, uma vez que este microrganismo não pode crescer nas células epiteliais escamosas da vagina *Chlamydia* são

parasitas intracelulares obrigatórios do epitélio colunar do cérvix. Realizar coleta de material endocervical, raspando-se o endocérvix para obter células e secreção. O swab deverá ser inoculado imediatamente em meio de transporte especial ou preparar as lâminas para coloração especial.

- Detecção de estreptococos do grupo "B" em mulheres: culturas cervicais não são aceitáveis e não se devem utilizar espéculos. Sugere-se coleta com swab do intróito vaginal e outro do orifício anorretal. Os swabs devem ser colocados em meios de transporte.
- Secreção prostática: poderá ser coletada após massagem digital pelo reto, podendo ser acompanhada de amostras de urina pré e pós-massagem. O material ejaculado também poderá ser submetido à análise.
- Na suspeita de *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres, a cultura é o método de escolha, sendo o material coletado do endocérvix. O encaminhamento deve ser feito em meio de transporte ou plaqueado imediatamente.

SECREÇÃO CERVICAL E VAGINAL

Amostra a ser coletada	Exames realizados	Material necessário para coleta
SECREÇÃO VAGINAL	Bacterioscopia Cultura para fungo/aeróbio Bacterioscopia	Swab seco para duas lâminas Swab com meio de transporte Swab seco para duas lâminas
SECREÇÃO ENDOCERVICAL	Cultura para micoplasma e ureaplasma PCR para <i>Chlamydia</i> PCR para HPV	Meio de transporte específico Meio de transporte específico Meio de transporte específico

Preparo da paciente

Recomenda-se:

- Não estar menstruada
- Evitar ducha e cremes vaginais na véspera da coleta
- Três dias de abstinência sexual

Coleta Vaginal

- Inserir um espéculo (sem lubrificante; usar água morna) na vagina.
- Retirar o excesso de muco cervical com swab de algodão.
- Inserir os swabs indicados, rodar por alguns segundos sobre o fundo do saco, retirar e voltar aos meios indicados no *kit*:
 - Swab seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.
 - Swab do meio de transporte para cultura aeróbia/fungos.

Coleta endocervical

- Inserir um espéculo (sem lubrificante) na vagina e retirar o excesso de muco cervical com swab de algodão.
- Inserir os swabs indicados no canal endocervical até a ponta do swab não ser mais visível, rodar por alguns segundos, retirar evitando o contato com a parede vaginal, e voltar aos meios indicados no *kit*:
 - Swab seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.
 - Swab seco: Mycoplasma/Ureaplasma - mergulhar o swab dentro da solução do tubo fornecido e agitar. Remover o swab e identificar o tubo.
 - Swab do meio de transporte específico para *Chlamydia trachomatis* - mergulhar o swab dentro da solução do tubo fornecido e agitar vigorosamente.
- Comprimir o swab contra a parede do tubo. Qualquer excesso de muco deve ser retirado da amostra.
- Remover o swab e identificar o tubo.

Cultura para anaeróbios do trato genital feminino

- Descontaminar o canal cervical com swab embebido de PVPI aquoso a 10%.
- Coletar amostra do trato genital superior de forma a obter material celular da parede uterina.

Amostras coletadas por laparoscopia, culdocenteses ou cirurgia, também são apropriadas para cultura de anaeróbios.

Cultura de dispositivo intra-uterino (DIU) tem valor estratégico para cultivo anaeróbio de *Actinomyces sp.*

SECREÇÃO URETRAL

A rapidez na entrega da amostra ao laboratório depende do sucesso da cultura.

N. gonorrhoeae é uma bactéria muito sensível e pode morrer rapidamente se não for semeada imediatamente após a coleta.

- 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 alça bacteriológica descartável ou swab estéril fino.
- Colocar a amostra em meio de transporte e realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.
- Encaminhar imediatamente para o laboratório.

Em pacientes assintomáticos, deve-se coletar a amostra através de massagem prostática ou com pequeno swab inserido alguns centímetros na uretra.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO ANAL

- Inserir o swab cerca de 1 cm do canal anal e fazer movimentos de lado a lado para coletar material das criptas anais.
- Colocar a amostra em meio de transporte e enviar o swab imediatamente ao laboratório.

CONSIDERAÇÕES PARA COLETA DE SECREÇÕES DO TRATO ANO-GENITAL

Cultura	Amostra recomendada
Bactéria	Fluido prostático, cervical, vaginal
Fungo	Anal, vaginal ou cervical
Anaeróbio	Aspirado do epidídimo, fluido amniótico, fluido de abscesso
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vaginal, fluido prostático
<i>Nisseria gonorrhoeae</i>	Cervical, uretral, anal
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Raspado uretral ou cervical
<i>Treponema pallidum</i>	Lesão genital Obs.: lesões secundárias de sífilis são mais comumente encontradas em membranas mucosas e pele (incluindo palmas da mão e solas do pé); mas qualquer parte do corpo pode ser afetada.
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Úlcera da área perianal e genitália e nódulo inguinal
<i>Mycoplasma hominis</i>	Canal endocervical e uretra

INSTRUÇÕES PARA FEZES

Devem ser coletadas no início ou fase aguda da doença, quando os patógenos estão usualmente presentes em maior número e, preferencialmente, antes da antibioticoterapia.

- Coletar as fezes e colocar em um frasco contendo o meio para transporte (Cary Blair ou salina glicerinada tamponada), fornecido pelo laboratório, em quantidade equivalente a uma colher de sobremesa. Preferir sempre as porções mucosas e sanguinolentas.
- Fechar bem o frasco e agitar o material.
- Se a amostra não for entregue no laboratório em uma hora, conservar em geladeira a 4°C, no máximo por um período de 12 horas. Marcar o horário da coleta.

SWAB RETAL

- Usar swab de algodão, certificando-se de que a ponta da haste que suporta o algodão está bem revestida.
- Umedecer o swab em salina estéril (não usar gel lubrificante) e inserir no esfíncter retal, fazendo movimentos rotatórios.
- Ao retirar, certifique-se que existe coloração fecal no algodão. O número de swabs depende das investigações solicitadas.
- Identificar a amostra e enviar ao laboratório no intervalo de 30 minutos ou utilizar o meio de transporte fornecido.

INSTRUÇÕES PARA URINA

A coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de duas a três horas.

CRIANÇAS

Assepsia rigorosa prévia dos genitais com água e sabão neutro, e posterior secagem com gaze estéril.

Modo de coleta:

O Ideal é jato intermediário (jato médio) espontâneo. Bem indicado em crianças que urinam sob comando, usado também em lactentes. Em lactentes em que não se consegue coletar através do jato médio, pode-se usar o saco coletor de urina, porém a troca deve ser realizada de 30 em 30 minutos e, ao trocar o coletor, refazer a assepsia. Em casos especiais (RN, lactentes de baixo peso, resultados repetidamente duvidosos) indicar punção vesical suprapúbica, que deverá ser realizada por médico.

ADULTOS SEXO FEMININO

A coleta de amostras do sexo feminino deve ser supervisionada pessoalmente por uma enfermeira ou auxiliar treinada. O processamento laboratorial deve ser feito dentro de duas horas. Caso não seja possível, as amostras deverão ser refrigeradas a 4°C até o momento da semeadura (no máximo de 24 horas).

- Remover toda a roupa da cintura para baixo e sentar no vaso sanitário.
- Separar as pernas tanto quanto for possível.
- Afastar os grandes lábios com uma das mãos e continuar assim enquanto fizer a higiene e coleta do material.
- Usar uma gaze embebida em sabão neutro, lavar de frente para trás e certificar-se que está limpando por entre as dobras da pele, o melhor possível.
- Enxaguar com uma gaze umedecida, sempre no sentido de frente para trás.
- Continuar afastando os grandes lábios para urinar. O primeiro jato de urina deve ser desprezado no vaso sanitário. Colher o jato médio urinário no frasco fornecido pela enfermagem (um pouco mais da metade do frasco). Evite encher o frasco.

- Fechar bem o frasco e caso haja algum respingo na parte externa do frasco, lave-o e enxugue-o.

ADULTOS SEXO MASCULINO

A coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de duas a três horas.

Pacientes cateterizados com sistema de drenagem fechada:

- Colher a urina puncionando-se o cateter na proximidade da junção com o tubo de drenagem.
- Não colher a urina da bolsa coletora.
- No pedido laboratorial deverá constar que o paciente está cateterizado.

Observação:

Não aceitar, sem exceção, as coletas de 24 horas dos materiais clínicos para cultura, particularmente de urina para o isolamento de micobactérias, devido a possível contaminação do material.

INSTRUÇÕES PARA ANAERÓBIOS

Anaeróbios podem estar envolvidos em infecções nas mais diversas partes do organismo humano. A coleta deve ser feita evitando-se contaminação com a flora normal endógena. Na solicitação médica deve constar também cultura para germes aeróbios. A boa comunicação entre o corpo clínico e o laboratório com o fornecimento de informações como impressão clínica, estado do paciente ou suspeita de organismo incomum assegura o sucesso da cultura anaeróbia.

Sempre que possível, mediante uma solicitação de cultura para anaeróbios, a amostra deve ser coletada através de aspirado com agulha e seringa ou através de fragmentos do tecido infectado.

A coleta com swab é a **menos recomendada** pelas seguintes razões:

- Material pode ser facilmente contaminado com organismos presentes na pele ou na superfície mucosa.
- Os anaeróbios ficarão expostos ao oxigênio ambiente.
- Material está sujeito à secagem excessiva.
- A quantidade de material encaminhada é relativamente pequena.
- São menos satisfatórios que os aspirados para preparação de esfregaços utilizados na análise microscópica, assim como para exame direto macroscópico (grânulos de enxofre - típico em actinomicose).

O uso de swab com meio de transporte específico deverá ser utilizado como última opção.

AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CULTURA DE ANAERÓBIOS

Sítio	Amostra Aceitável	Amostra Inaceitável
CABEÇA E PESCOÇO	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado do abscesso coletado com agulha e seringa após descontaminação da superfície - Material de biópsia coletado por cirurgia - Swab obtido por cirurgia quando for impraticável a aspiração 	<ul style="list-style-type: none"> - Swab de orofaringe e nasofaringe - Swab gengival - Material superficial coletado com swab
PULMÃO	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado transtraqueal - Material obtido de punção pulmonar percutânea - Material de biópsia obtido cirurgicamente - Amostra broncoscópica obtida com cateter "double-lumen" evitando 	<ul style="list-style-type: none"> - Escarro expectorado - Escarro induzido - Aspirado endotraqueal Material broncoscópico não coletado adequadamente

	contaminação	
SNC	<ul style="list-style-type: none"> - Liquor - Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa - Material de biópsia obtido por cirurgia 	- Swab aeróbio
ABDÔMEN	<ul style="list-style-type: none"> - Fluido peritoneal obtido com agulha e seringa - Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa - Bile - Material de biópsia obtido por cirurgia 	- Swab aeróbio
TRATO URINÁRIO	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado suprapúbico 	- Urina Urina de cateter
TRATO GENITAL FEMININO	<ul style="list-style-type: none"> - Material de laparoscopia - Aspirado endometrial obtido por sucção ou curetagem após descontaminação - Material de biópsia obtido por cirurgia - DIU (Dispositivo intrauterino), somente para <i>Actinomyces</i> sp 	- Swab vaginal ou cervical
OSSOS E ARTICULAÇÕES	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado obtido com agulha e seringa - Material de biópsia obtido por cirurgia 	- Material de superfície coletado com Swab
TECIDOS MOLES	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado obtido com agulha e seringa - Material de biópsia obtido por cirurgia - Aspirado do trato sinusal obtido com cateter plástico - Aspirado profundo de ferida aberta obtido após descontaminação da pele 	<ul style="list-style-type: none"> - Material de superfície coletado da pele ou bordos da ferida - Material coletado com Swab
ESTÔMAGO E INTESTINO DELGADO	<ul style="list-style-type: none"> - Somente na Síndrome de Alça Cega ou Síndrome de Má Absorção 	
INTESTINO GROSSO	<ul style="list-style-type: none"> - Somente para cultura ou pesquisa de toxinas quando houver suspeita de <i>C. difficile</i> ou <i>C. botulinum</i> 	

TEMPO DE TRANSPORTE X VOLUME DE AMOSTRA E/OU MÉTODO COLETADO

Amostra	Tempo ótimo para transporte ao laboratório
Aspirados:	
- inferior a 1ml	- 15 minutos – temperatura ambiente
- superior a 1m	- 30 minutos – temperatura ambiente
Meio de transporte anaeróbio	- 2 horas – temperatura ambiente
Tecido ou material de biópsia	
- recipiente estéril	- 30 minutos – temperatura ambiente
- meio de transporte ou bolsa anaeróbia	- 2 horas – temperatura ambiente
Swabs anaeróbios	
- em tubo com atmosfera anaeróbia	- 1 hora – temperatura ambiente
- em meio de transporte anaeróbio	- 2 horas – temperatura ambiente

3. MICROSCOPIA E COLORAÇÃO

DIRETO SEM COLORAÇÃO

SALINA

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none">- Salina (soro fisiológico - 0,85% de cloreto de sódio)- Lâmina- Lamínula	<ul style="list-style-type: none">- Permite observar a morfologia bacteriana e avaliar a existência de motilidade- Usada para pesquisa a fresco de <i>Trichomonas</i> em secreções, fungos (leveduri-formes ou filamentosos) e em diferentes materiais, etc.	<ul style="list-style-type: none">- Gotejar a salina (uma gota) no centro de uma lâmina de microscopia e nela suspender uma colônia ou uma alçada do material a ser investigado- Cobrir com uma lamínula e examinar ao microscópio, com objetiva de 40X ou 100X (óleo de imersão)

HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none">- Hidróxido de Potássio em solução aquosa a 10% ou 20%- Lâmina- Lamínula	<ul style="list-style-type: none">- Usado para pesquisa de fungos (leveduriformes e particularmente filamentosos) em material biológico na presença de muco, restos celulares, pêlos, unhas, etc.- Facilita a microscopia por dissolver a queratina e o muco, destacando as estruturas fúngicas, quando presentes.	<ul style="list-style-type: none">- Colocar uma pequena amostra do material a ser pesquisado no centro da lâmina- Suspender o material com uma a duas gotas de KOH- Cobrir com lamínula e aguardar 30 minutos ou- Aquecer ligeiramente a lâmina para acelerar o clareamento- Examinar com objetiva de 10X ou 40X, fechando o diafragma- As lâminas poderão ser colocadas em câmara úmida e, após 24 horas, realizar uma segunda leitura microscópica

EXAME EM CAMPO ESCURO

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none">- Microscópio com condensador de campo escuro e, quando possível, objetiva de 100X com íris- Lâmina- Lamínula- Salina- Óleo de imersão.	<ul style="list-style-type: none">- Para observar a motilidade de bactérias dificilmente observadas em microscopia direta com salina, como é o caso do <i>Treponema pallidum</i> e da <i>Leptospira sp</i>- Pode ser usada também para observar a motilidade do <i>Campylobacter sp</i> e outras bactérias	<p>Para o <i>Treponema pallidum</i>:</p> <ul style="list-style-type: none">- Atritar as bordas da lesão suspeita com um swab ou alça bacteriológica- Colher o exsudato com a própria alça ou fazer um imprint com a lâmina- Cobrir com a lamínula (utilizar uma gota de salina)- Realizar a pesquisa rapidamente <p>Para o <i>Leptospira</i>:</p> <ul style="list-style-type: none">- Utilizar a urina recém-emitida, centrifugada e examinado o sedimento- Em campo escuro, colocar óleo de imersão entre o condensador e a parte inferior da lâmina (encostar o condensador na lâmina)- Observar com objetiva de 40X para obter o foco- Avaliar as condições do material, fazendo-se, a seguir, a bacterioscopia por imersão, com objetiva de 100X.

TINTA DA CHINA

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none">- Tinta da China (nanquim)- Lâmina- Lamínula	<ul style="list-style-type: none">- Principalmente para pesquisa de criptococos em liquor ou outros materiais, permitindo destacar a cápsula deste fungo contra um fundo negro	<ul style="list-style-type: none">- Suspender o sedimento do liquor ou uma colônia do meio de cultura em uma gota de tinta da China, fazendo-se um filme bem delgado entre a lâmina e a lamínula- Observar com objetivas de 10X e 40X- Caso esteja muito espesso, adicionar uma pequena gota de salina esterilizada na suspensão para facilitar a observação- <u>Erro comum</u>: confundir linfócitos com criptococos. A diferenciação é feita através da observação do núcleo refringente e gemulação do fungo.

COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram é usada para classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular e comportamento diante dos corantes. No laboratório de microbiologia clínica é um teste adicional rápido para o diagnóstico de agentes infecciosos, sendo também utilizado para avaliar a qualidade da amostra clínica analisada.

As interpretações dos esfregaços corados pelo Gram envolvem considerações relacionadas com as características da coloração, tamanho, forma e agrupamento das células. Estas características podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo idade da cultura, o meio de cultivo utilizado, a atmosfera de incubação e a presença de substâncias inibidoras.

Não se pode deixar de destacar que a coloração de Gram somente será um recurso rápido e útil quando for corretamente realizada (do ponto de vista técnico) e interpretada por profissionais experientes.

UTILIZAÇÃO

- Para bacterioscopia da maioria dos materiais biológicos ou culturas de microrganismos em meios sólidos ou líquidos.
- Nas amostras analisadas de culturas jovens (<< 24h) de meio de cultura sem inibidores e amostras clínicas recém-coletadas (são as que fornecem melhores resultados).
- Na verificação da morfologia bacteriana a partir de esfregaços de cultura em caldo.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS *

- Lâminas de vidro limpas e desengorduradas 7,5 cm x 2,5 cm
- Tubos estéreis
- Alça bacteriológica
- Meio de cultura
- Pipeta e ponteiros estéreis
- Luvas (quando necessário)
- Cronômetro
- Salina estéril 0,85%
- Centrífuga e/ou citocentrífuga
- Lata para descartar o material contaminado
- Incinerador ou bico de Bunsen
- Óleo de imersão
- Agitador tipo Vortex
- Lâminas de bisturi
- Chapa com aquecimento brando para fixação dos esfregaços (50°C)
- Microscópio
- Metanol ou etanol absoluto para fixação

* **Observação:** Os materiais citados acima são opcionais, dependendo da amostra clínica coletada e da rotina laboratorial.

ESFREGAÇOS

Os esfregaços devem ser preparados com um gradiente de espessura suficientemente denso para facilitar a visualização, mas, também, bastante esparsos para revelar as características do agrupamento. Utilizar, de preferência, lâminas limpas e novas (não oxidadas). Os melhores resultados serão obtidos se as mesmas permanecerem no álcool até o momento do uso.

Técnica para preparo do esfregaço:

- Identificar a lâmina de maneira segura.
- Rolar toda a superfície do swab sobre a lâmina para não destruir as células.
- Fixar rapidamente na chama.
- Quando material é escasso, demarcar a área do esfregaço.
- Proceder o método de coloração mais apropriado.

Material Clínico

Amostra coletada com swab	<ul style="list-style-type: none"> - Rodar o <i>swab</i> suavemente pela lâmina limpa, evitando a destruição dos elementos celulares e dos agrupamentos - Quando somente um <i>swab</i> for coletado, colocá-lo em um tubo estéril contendo uma pequena quantidade de salina estéril (0,4 ml) e agitar (vortex) - Comprimir o <i>swab</i> contra as paredes do tubo e utilizá-lo para fazer o esfregaço. O restante do material pode ser inoculado nos meios de cultura. - Observação: materiais clínicos coletados com <i>swab</i> são menos recomendados para cultura. Coletar, sempre que possível, dois <i>swabs</i>: um será utilizado para fazer o esfregaço e o outro para cultura.
Aspirados, exsudatos, etc.	<ul style="list-style-type: none"> - Materiais recebidos em seringas serão transferidos para um tubo estéril e agitados (vortex), quando necessário - Selecionar a porção mais purulenta ou mucosa com pipeta ou alça bacteriológica - 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
Escarro	<ul style="list-style-type: none"> - Com auxílio de alça bacteriológica ou um palito de madeira, "pescar" uma porção purulenta do escarro que seja representativa - Rolar esta porção na parede do frasco para separar do material salivar - Em seguida, colocar o material na extremidade de uma lâmina limpa confeccionando um esfregaço delgado - Quando a quantidade de saliva for grande e pequenas porções purulentas forem visíveis, transferir a amostra para uma placa de Petri para facilitar a retirada do material representativo
Liquor ou outros fluidos orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> - Alguns laboratórios utilizam a citocentrífuga (<i>cytopspin</i>) para concentrar os líquidos orgânicos e fazer os esfregaços. Este método tem sido utilizado para aumentar a sensibilidade da coloração de Gram, diminuir o tempo de centrifugação e agilizar o resultado. Materiais aparentemente límpidos devem ser previamente centrifugados a 2.000-5.000 rpm /15 minutos e o esfregaço feito a partir do sedimento - Após a centrifugação, remover o sobrenadante com uma pipeta estéril, deixando, aproximadamente, 0,5 ml de sedimento - Colocar uma gota do sedimento numa lâmina limpa, sem espalhar e deixar secar - Para aumentar a concentração do fluido a ser examinado, adicionar uma segunda gota na mesma área da lâmina, anteriormente utilizada
Urina jato médio	<ul style="list-style-type: none"> - Homogeneizar bem o material e utilizar uma gota da amostra, sem centrifugação
Biópsias ou fragmentos de tecido	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar o material em uma placa de Petri estéril - Triturar com auxílio de um bisturi - Preparar os esfregaços fazendo vários <i>imprints</i> numa lâmina limpa, de preferência, estéril

Cultura em caldo

- Transferir uma a duas gotas para uma lâmina limpa utilizando alça bacteriológica ou pipeta;
- Espalhar suavemente o material a fim de obter um esfregaço delgado.

Meio sólido

- Utilizar uma gota de salina estéril em uma lâmina limpa;
- Transferir uma pequena porção da colônia com alça bacteriológica;
- Misturar suavemente para obter um esfregaço levemente turvo e homogêneo.
- Observação: para evitar a formação de aerossóis, nunca misturar o material vigorosamente.

Fixação do Esfregaço

Calor

Todo o esfregaço, antes de ser submetido a coloração, deverá estar seco (exposto ao ar), sendo fixado com calor brando (50°C). A fixação excessiva e o superaquecimento irão distorcer a morfologia celular e a fixação insuficiente permitirá a saída do material durante o processo de coloração. Deixar a lâmina esfriar antes de iniciar a coloração.

Metanol ou Etanol

A fixação pelo metanol ou etanol também pode ser utilizada. Além de prevenir a lise das hemácias, evita que os esfregaços, principalmente os de urina, desprendam-se no momento da coloração. Deixar o esfregaço secar numa superfície plana; após, colocar uma a duas gotas de álcool (1min), drenando o excesso, sem lavar. Não aquecer a lâmina antes da coloração.

PREPARO DO REAGENTE PARA A COLORAÇÃO DE GRAM (MODIFICADO POR HUCKER)

Cristal-violeta - solução estoque:

Solução A –

Cristal-violeta	40 g
Álcool etílico a 95%	400 ml

Solução B –

Oxalato de amônio	16 g
Água destilada	1600 ml

Validade das soluções A e B: 1 ano em temperatura ambiente

Cristal-violeta - solução de uso:

Solução A	40 ml
Solução B	160 ml

- Misturar as duas soluções.
- Deixar em repouso e filtrar após 24 horas.

Lugol (mordente):

Iodo metálico	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300 ml

Validade: seis meses em temperatura ambiente

- Misturar o iodo e o iodeto de potássio em um graal, até que estejam bem homogeneizados;
- Acrescentar água lentamente para dissolução completa. Guardar em frasco de âmbar.

Precauções: a solução de iodo/iodeto de potássio é corrosiva. Evitar inalação, ingestão ou contato com a pele.

Descolorantes:

Álcool etílico a 95% – agente descolorante lento ou
Álcool etílico a 95% e acetona (v/v) – agente descolorante intermediário.
Exige maior habilidade por parte do operador para que não ocorra hiperdescoloração.

Validade: um ano armazenado em frasco de âmbar a temperatura ambiente.

Precauções: etanol e acetona são inflamáveis.

Contracorante:

Solução de reserva -

safranina	5 g
álcool etílico a 95%	500 ml

Solução de trabalho -

solução de reserva	10 ml
água reagente	90 ml

Validade: um ano em temperatura ambiente ou fucsina básica a 0,1% ou 0,2% em água reagente; e seis meses em temperatura ambiente – frasco de âmbar.

- Misturar suavemente até a dissolução.

COLORAÇÃO

- Cobrir a área com a solução de cristal-violeta por cerca de um minuto.
- Decantar o cristal-violeta e lavar suavemente com a própria solução de iodo ou água da torneira. (Obs.: lavagem excessiva nesta etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas).
- Cobrir a área do esfregaço com a solução de iodo durante cerca de um minuto.
- Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona (1:1), até que o solvente escorra incolor.
- Alternar com água corrente (jato fraco). O tempo usualmente utilizado nesta etapa é de cerca de 10 segundos. (Obs.: lavagem excessiva nesta etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas, assim como, a pouca descoloração pode resultar em pouca retirada do cristal violeta, ocasionando uma tonalidade azulada nas bactérias Gram-negativas).
- Cobrir o esfregaço com a solução de safranina (ou Fucsina básica 0.1% a 0.2%), por cerca de 30 segundos.
- Lavar com água corrente.
- Deixar secar ao ar, em temperatura branda (50°C).

COMO REPORTAR OS RESULTADOS

As bactérias Gram-positivas retêm o cristal-violeta e se apresentam com coloração violeta enquanto as Gram-negativas são descoradas pelo álcool-acetona, sendo, portanto, coradas com o corante de fundo (fucsina) e se apresentam róseas.

LEITURA DO GRAM

- Utilizando a objetiva de menor aumento (10X), fazer uma análise do esfregaço como um todo, avaliando:
 - a qualidade da coloração e a espessura do esfregaço;
 - se o material clínico coletado é apropriado para cultura, observando a quantidade relativa de leucócitos, hemácias, células epiteliais;
 - a presença de bactérias pertencentes a microbiota normal, indicando uma coleta inadequada da amostra clínica;
 - localização e agrupamento bacteriano;
 - filamentos, pseudo-hifas e leveduras.

- Passar para a objetiva de imersão (100X) e examinar várias áreas para melhor avaliação da coloração e dos diferentes tipos de microrganismos presentes, principalmente perto de células inflamatórias.

Sistema de Quantificação

Células e Polimorfonucleares (PMN)

Média em 10 campos (10X de aumento) Microrganismos

Média em 15 a 20 campos (100 X aumento)

Neg.	+	++	+++	+	++	+++	++++
Neg.	Raras	Pouca	Muitas	Raros	Poucos	Muitos	Numerosos
0	1-9	10-24	>>25	<<1	1-5	6-19	>>20

CAUSAS COMUNS DE ERRO

- Precipitação do corante PP simula cocos Gram-positivos.
- Uso de lâminas que não tenham sido pré-limpas ou desengorduradas.
- Espessura do esfregaço PP pode corar irregularmente.
- Superaquecimento na fixação pelo calor PP destruição da morfologia.
- A descoloração insuficiente com álcool-acetona permite a retenção do cristal-violeta, o que dificulta a observação de bactérias Gram-negativas. Por outro lado, esfregaços obtidos de culturas velhas ou contendo numerosas bactérias mortas ou expostas à ação de antibióticos apresentam irregularidades na coloração. As bactérias Gram-positivas perdem a capacidade de reter o cristal-violeta, apresentando-se Gram-negativas; as Gram-negativas podem corar-se mais fracamente pela safranina, podendo simular a ocorrência de infecções mistas (Gram-positivas/Gram-negativas).
- A discordância de resultado entre o esfregaço corado pelo Gram e a cultura pode estar relacionada com a coleta ou meios de transportes e conservantes inadequados.
- Um resultado positivo de Gram com cultura negativa pode sugerir contaminação do corante, presença de agentes antimicrobianos na amostra do paciente ou falha no crescimento de microrganismos devido às condições utilizadas (atmosfera, ação seletiva dos meios de cultura, etc.).

CONTROLE DE QUALIDADE

- Verificar diariamente a aparência dos reagentes. Se a solução de cristal-violeta precipitar, refiltre antes de usar. A evaporação pode afetar a eficácia dos reagentes. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam trocadas regularmente, dependendo da demanda.
- Diariamente e quando novos reagentes forem preparados, corar, juntamente com os esfregaços da rotina, lâminas controles. Esfregaços de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) são preparados e fixados. Resultados esperados:
 - bacilos Gram-negativos, coloração rósea.
 - cocos Gram-positivos, coloração violeta.
- Sistema de revisão dos resultados do Gram:
 - a revisão diária de lâminas de Gram, selecionadas pelo supervisor, pode ajudar a determinar a necessidade de treinamento e adicionar informações de relevância clínica.
 - comparar resultados da cultura com a leitura do Gram.
- Fazer manutenção preventiva e limpeza dos microscópios.

OUTRAS COLORAÇÕES

ALBERT LAYBORN (CORINEBACTÉRIAS)

Solução A

Azul-de-toluidina	0,15g
Verde-malaquita	0,20g
Ácido acético glacial	1ml
Álcool 95	2ml
Água destilada	100ml

Solução B

Iodo	2g
Iodeto de potássio	3g
Água destilada	300ml

Execução

- Corar três minutos com solução A;
- Escorrer e, lavar com água corrente, cobrir com solução B;
- Após dois minutos, lavar com água corrente rapidamente;
- Enxugar com papel de filtro e secar sem passar na chama.
- Observar o corpo bacteriano corado em verde e os grânulos metacromáticos (castanho- escuro).

COLORAÇÃO DE FLAGELOS -IMPREGNAÇÃO PELO MÉTODO DE RHODES

Mordente

Ácido tânico, solução aquosa a 10%	10ml
Alúmen de potássio (solução aquosa saturada)	5ml
Óleo de anilina, solução saturada	1ml

- Dissolver, por agitação, o precipitado que se forma.
- Completar com cloreto férrico, solução a 5%, 1ml.

Nitrato de prata amoniacal

- Dissolver 5g em 10ml de água destilada.
- Separar 5ml e, ao restante, acrescentar, gota a gota, solução concentrada de amônio, agitando sempre até formar-se um precipitado castanho que volta a se dissolver.
- Juntar gota a gota a solução inicial de nitrato de prata que se havia separado, até surgir leve turvação que persiste com a agitação.

Execução

- Preparar esfregaço;
- Filtrar o mordente sobre o esfregaço e deixar três a cinco minutos;
- Lavar abundantemente com água;
- Cobrir com o nitrato de prata amoniacal e aquecer suavemente até a emissão de vapores, por três a cinco minutos.

Resultado

Células em castanho-escuro e os flagelos mais claros em fundo ligeiramente granuloso.

COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Solução de carbolfucsina

Fucsina básica	0,3 g
Álcool etílico a 95%	10 ml
Cristais de fenol derretidos	5 ml
Água destilada	95 ml

- Dissolver a fucsina básica no álcool e o fenol na água. Misturar as duas soluções.
- Deixar repousar por vários dias antes de usar.

Ácido-álcool

Álcool etílico	97 ml
Ácido clorídrico concentrado	3 ml

Coloração de fundo (azul-de-metileno)

Azul-de-metileno	0,3 ml
Água destilada	100 ml

Execução

- Cobrir a superfície da lâmina com a solução de carbolfucsina.
- Aquecer a lâmina coberta com o corante, lentamente com auxílio de um bico de Bunsen, até a emissão de vapores, tomando o cuidado para não deixar ferver.
- Aquecer com calor baixo ou intermitente por um período de três a cinco minutos.
- Deixar a lâmina esfriar.
- Lavar a lâmina com água corrente.
- Cobrir a lâmina com solução de álcool - ácido a 3% e descorar o esfregaço até que o corante não drene mais da lâmina.
- Lavar a lâmina com água corrente e esgotando todo resíduo da mesma.
- Cobrir a lâmina com o corante de contraste (azul de metileno), por 20 a 30 segundos.
- Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar naturalmente sem forçar com papel de filtro.
- Examinar o esfregaço com objetiva de imersão no aumento de 100x.

4. SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA

MATERIAL CLÍNICO E OS RESPECTIVOS MEIOS DE CULTURA E MICROSCOPIA

Meios de cultura para semeadura dos principais materiais clínicos e indicação de exames microscópicos.

Material	Meios De Cultura ¹								Lâmina
	AC	AS	MC	TIO	Outro	L J	SAB	MYC	
Abscesso profundo		X	X	X					uma
Ferida cutânea/cirúrgica		X	X			X	X	X	uma
Abscesso cerebral	X	X	X	X		X	X	X	duas
Abscesso pulmonar	X	X	X	X					duas
Biópsia	X	X		X					duas
Coprocultura (fezes)			X		SS				não
Líquido de Diálise	X	X	X						uma
Endométrio/ Amniótico	X	X		X					uma
Escarro piogênicos		X	X						duas
Escarro para Tuberculose						X			uma
Esperma/ Prostático		X	X						uma
Fístula/ Dreno		X	X						não
Gânglio	X	X		X		X	X	X	duas
Lavado Brônquico (BAL)	X		X			X	X	X	uma
Líquor (LCR)	X	X				X	X	X	duas
Nasal/ Orofaringe		X	X						não
Oso (Biópsia / Aspirado)		X	X	X					uma
Ocular	X	X	X						duas
Orofaringe		X	X						uma
Ouvido	X	X	X						uma
Peritonia/ Ascítico	X	X	X	X					uma
Pleural	X		X	X		X			duas
Ponta de cateter		X							não
Sangue/ Hemocultura	X	X							uma
Uretral	X	X			TM				uma
Urina					CLED				uma
Vaginal/ Endocervical	X	X	X		TM				uma

¹- AC = ágar chocolate; AS = ágar sangue; MC = ágar Mac Conkey; TIO = caldo tioglicolato; LJ = ágar Lowenstein Jensen; SAB = ágar Sabouraud; MYC = Mycosel; SS = ágar Salmonella-Shigella; TM = ágar Thayer Martin (opcional); CLED = ágar CLED

Cultura para fungos ou micobactérias

- Para fungos: Sabouraud e Mycosel, ver orientação específica para semeadura
- Para micobactérias: Lowenstein Jensen, materiais contaminados com flora devem ser previamente descontaminados (escarro, urina, lavado bronquio-alveolar, fezes)

Coprocultura

- Recomendava-se semear em caldo enriquecedor do tipo Selenito, Tetracionato, etc., que tem valor duvidoso, sendo atualmente indicado para pesquisa de portadores.

Escarro para tuberculose

- Deve ser conservado em geladeira ou tratado para descontaminação, antes de semear em Lowenstein Jensen.

Lavado brônquico

- Homogeneizar o material em vortex;
- Centrifugar parte do material e fazer duas lâminas com o sedimento;
- Se houver pedido de pesquisa de micobactérias e fungos, fazer quatro lâminas;
- Semear 10 µL com alça descartável ou calibrada e semear em Ágar Chocolate para contagem de colônias (1/100);
- Diluir 1 ml da amostra em 9,0 ml de salina estéril, homogeneizar e semear 10 µL em Ágar Chocolate para contagem de colônias (1/1.000);
- Semear desta mesma diluição com a alça de 1 µL em Ágar Mac Conkey para contagem de colônias (1/10.000).

Líquido Céfal Raquidiano (LCR)

- Centrifugar por 10 minutos/ 2.000 rpm (rotações por minuto), quando purulento, semear sem centrifugar;
- Semear em Ágar Chocolate + Ágar Sangue + Caldo Tioglicolato.
- Quando solicitado, pesquisar *Criptococos*, usando coloração com Tinta da China.

Ponta de cateter

- Cinco cm da ponta do cateter deve ser rolada 5 vezes sobre a placa de Ágar Sangue, utilizando a técnica semi-quantitativa de Maki.
- Quando enviado pedaço maior de cateter pode-se injetar 1 ml de salina cultivando separadamente (lúmen); a superfície externa pode ser semeada pela técnica de Maki.

Hemoculturas positivas

- Semear em Ágar Chocolate e fazer bacterioscopia (Gram).
- Frascos para micobactérias, fazer bacterioscopia (Ziehl).

Urina

- Dever ser semeada com alça calibrada de 10 µL em Ágar CLED (Brolacin).
- Se houver pedido de bacterioscopia: colocar 10 µL da urina sobre uma lâmina nova e deixar secar, corar pelo Gram, e verificar a presença de bactérias.
- Para diagnóstico da tuberculose: deve ser guardada em geladeira ou descontaminada antes de semear.

Secreção vaginal, endocervical, uretral e urina

- Fazer exame à fresco de secreção vaginal para pesquisa de *Trichomonas*;
- Centrifugar a urina para pesquisa de *Trichomonas*;
- Na cultura para *Neisseria gonorrhoeae* é suficiente Ágar-Chocolate; para melhorar o isolamento, semear material endocervical e uretral, utilizando o meio seletivo de Thayer Martin.
- *Mycoplasma* e *Ureaplasma* swab uretral ou endocervical, removendo previamente a secreção e colhendo as células da mucosa por rotação do swab no canal; usar meio de transporte específico.

Para amostras sólidas: biópsias, gânglios, amostras de tecidos, etc

- Fragmentar o material com um gral e pistilo de porcelana ou vidro estéreis contendo 1-2 ml de salina estéril ou caldo BHI (Brain Heart Infusion) ou TSB (Trypticase Soy Broth);
- Semear os fragmentos ou a porção líquida, e guardar o restante do material na geladeira para eventual uso.

Estudos quantitativos são trabalhosos pois dependem de pesar o material sólido, triturá-lo, diluir em volume definido de caldo (BHI, TSB ou Tioglicolato), bem como semear volume definido (10 ou 100ml com pipeta calibrada, usando ponteira estéril). O cálculo para a contagem de colônias deve levar em conta o número de gramas de tecido usado e a diluição do caldo (UFC/grama de tecido).

Líquido de diálise

- Recomenda-se fazer cultura quantitativa semeando-se como urina, com alça calibrada e contagem de colônias, usando alça de 10 µL e liberando o resultado em UFC/ml (multiplicando por 100). Paralelamente faz-se cultura qualitativa semeando 2 a 3 ml em 5 ml de caldo (TSB, BHI ou Tioglicolato). No caso de cultura quantitativa negativa e qualitativa positiva, relatar: cultura positiva para (nome da bactéria isolada), menor que 10² UFC/ml.

Casos especiais

- No caso de secreção prostática, em que o material é bastante escasso, e existe contaminação uretral, recomenda-se semear rapidamente após a coleta com alça calibrada de 10 ml, e o resultado deve-se relatar em UFC/ml (multiplicando o número de colônias significativas do mesmo agente por 100), como para uroculturas.

Para outros materiais escassos colhidos com swab em meio de transporte (material de vesículas, swab de córnea ou conjuntiva, uretral, etc.), pode-se semear diretamente o swab nos meios de cultura indicados, ou tentar obter uma concentração do material do swab colocando-o em tubo estéril com 0,5 ml de salina estéril. Em seguida, agitar no vortex (mixer), centrifugar e utilizar o sedimento como inóculo, ou fazer esfregaço para bacterioscopia.

Escolha de meios de cultura seletivos em relação ao agente

Agente	Meio específico de acordo com manuais de fabricantes
Bordetella pertussis	Ágar sangue Bordet-Gengou
Brucella spp	Brucella agar
Campylobacter jejuni	Campylobacter agar
Corynebacterium diphtheriae	Ágar cistina-telurito
Legionella spp	Ágar carvão-extrato de levedura tamponado
Listeria monocytogenes	Ágar Listeria McBride
Mycoplasma/ureaplasma	Transporte: Meio B10 Shepard Cultura: Meio A7 Shepard
Neisseria	Thayer Martin
Neisseria meningitidis	Thayer Martin
Vibrio spp	TCBS
Obs: existem meios cromogênicos específicos para diferentes patógenos	Salmonella spp. e S. typhi, E. coli O 157. Para algumas espécies de Candida, Listeria monocytogenes, etc.

PROCEDIMENTOS PARA SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA

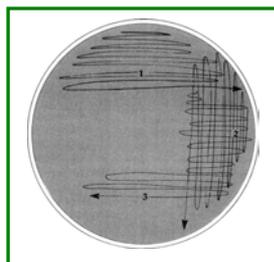
SEMEADURA QUALITATIVA

- Organizar as placas, pré-aquecidas em estufa (ideal para fastidiosos), ou à temperatura ambiente, sobre a bancada conforme o material a ser semeado.
- Identificá-las com o número da amostra e iniciais do paciente.

- Separar as lâminas correspondentes à cada exame, a serem preparadas e identificá-las.
- Homogenizar o material, quando líquido (urina, LCR, sangue, pleural, etc.).
- Escolher a porção mais purulenta no caso de secreções, ou no caso de fezes, a parte com sangue, muco ou pus.
- Os swabs deverão ser rolados sobre os meios de cultura, seguindo a sequência dos mais ricos para os mais seletivos (Ágar Chocolate, Ágar Sangue, Mac Conkey).
- Com material muito líquido (LCR, pleural não purulento) concentrar o material por centrifugação a 2.500 rpm (1500 g) por 10-15 minutos e semear o sedimento.
- Na semeadura de rotina pode-se utilizar placas com divisões de dois e três compartimentos para racionalização de gastos, mas seu uso exige maior habilidade na semeadura a fim de se obter colônias isoladas. Ex.:
 - hemocultura em placa tríplex: Ágar sangue, Ágar chocolate e Ágar Mac Conkey.
 - secreções em placa dupla: Ágar sangue e Ágar Mac Conkey, proceder uma semeadura que permita o crescimento de colônias isoladas, etc.

Técnica de Semeadura Qualitativa

A semeadura para cultivo qualitativo pode ser feito com o próprio swab (do meio de transporte), ou amostra do material removida com alça (estéril) flambada e semeada de forma a obter um gradiente decrescente de concentração do inóculo, que permita o isolamento de todas as colônias diferentes. Recomenda-se que a semeadura e a leitura das placas sejam realizadas pelo mesmo profissional para aprimorar a técnica de semeadura e isolamento de colônias.



- Descarregar o material num canto da placa;
- Flambar a alça;
- Esfriar a alça em um canto do ágar;
- Semear partindo da ponta da primeira semeadura.
- A cada mudança de direção flambar a alça e esfriá-la.

SEMEADURA QUANTITATIVA

Materiais indicados ou recomendados

- Urina
- BAL (lavado bronco alveolar)
- Aspirado traqueal
- Biópsia de tecido
- Líquido de diálise
- Secreção prostática
- Cateter (técnica de Maki e outras)

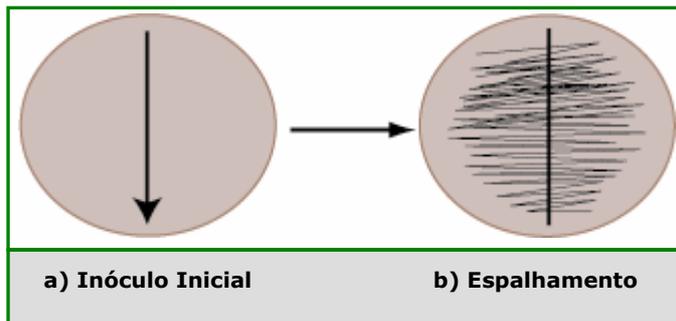
Técnica de Semeadura Quantitativa

O cultivo quantitativo baseia-se na semeadura de um volume conhecido de material e a contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônia) obtidas após incubação. Utilizam-se dois artifícios para o efeito de diluição do material:

- Uso de pequenos volumes: normalmente de 1, 10 ou 100 μ L. O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 ml, relativo ao volume inoculado; 1.000, 100 ou 10, respectivamente. Pode ser realizada utilizando-se volume de material definido por alça calibrada ou pipeta com ponteira estéril.
- Técnicas dilucionais: costuma-se utilizar a diluição seriada do material em escala decimal, isto é, 1:10, 1:100, 1:1.000 ... O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 ml, relativo à diluição utilizada; 10, 100, 1.000 ..., respectivamente.

Procedimentos gerais

- Homogeneizar o material com agitação manual em diferentes direções ou em vortex (mixer).
- Obter o volume definido pela técnica com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada. No caso da alça, observar a integridade da película formada até depositá-la na parte superior da placa. Ainda com a alça, sem flambar até o final da sementeira, distribuir o material em linha reta até a outra extremidade. Perpendicularmente, distribuir o material por toda a superfície de maneira uniforme. Repetir o mesmo procedimento por 3 vezes, ou até que a superfície da placa esteja seca, alterando a direção da estria (vide figura abaixo).
- Evitar o uso de placas úmidas e, após sementeira, não incubar caso haja umidade na superfície do ágar.
- Evitar o rompimento do ágar, estriando o material suavemente.
- Uma suspensão com 10^5 UFC/ml deve resultar em um tapete de colônias que cubra toda a superfície do ágar de maneira uniforme, com colônias confluentes.



INCUBAÇÃO

A incubação deve seguir alguns parâmetros determinados.

Atmosfera

- Para bactérias não exigentes em secreções, urina, fezes, etc. incubar em estufa em atmosfera ambiente.
- Para bactérias exigentes tais como: pneumococos, hemófilos e Neisserias ou fastidiosos incubar em microaerofilia (Jarra com vela acesa de modo a obter 3-5% de CO_2).
- Para *Campylobacter* é necessário tensão de 5 a 10% de CO_2 e restrição de O_2 sendo conveniente o uso de geradores específicos.
- Para bactérias anaeróbias, incubar em sistema de anaerobiose estrita.

Temperatura

- $36^\circ C \pm 1^\circ C$ é a temperatura para a grande maioria das bactérias da rotina, incluindo os anaeróbios e micobactérias.
- Fungos podem ser cultivados a $30^\circ C$ ou 25 e $35^\circ C$.
- Temperatura à $42^\circ C$ pode ser necessário para isolar espécies de *Campylobacter*, *Acinetobacter aumannii*, e algumas espécies de *Pseudomonas*.

Umidade

- Bactérias fastidiosas e exigentes (neisserias patogênicas e hemófilos) crescem melhor se forem incubadas num recipiente com tensão de 5% de CO_2 com um chumaço de algodão embebido em água estéril.

Tempo

- Em geral a primeira leitura é realizada com 18 a 24 horas de incubação ou em casos de urgência para iniciar a identificação e antibiograma, a partir de 6 horas é possível visualizar crescimento de algumas enterobactérias.
- Para anaeróbios é recomendável a primeira leitura com 48 a 72 horas de incubação.

- Para bactérias exigentes ou de crescimento lento o período de incubação pode ser bastante prolongado: Micobactérias de 3 a 45 dias; *Nocardia*, 4 a 7 dias; *Brucella* 3 a 7 dias (hemoculturas até 45 dias).

Leitura

Alguns aspectos são fundamentais na leitura inicial das placas para se estabelecer um diagnóstico presuntivo e direcionar o exame.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DAS COLÔNIAS

Tamanho

O tamanho das colônias deverá ser considerado na placa como um todo, uma mesma cepa pode formar colônias de tamanhos variados em diferentes pontos da placa:

- Puntiforme (<1 mm de diâmetro) - colônias muito pequenas, características de bactérias mais exigentes.
- Pequena (até 2 mm de diâmetro) – *Shigella* e *Yersinia* costumam crescer em MaC Conkey e Salmonella-Shigella como colônias pequenas e lactose negativa. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp, *Enterococcus* spp, pneumococos, *Streptococcus* spp. *Cândida* spp e alguns esfafilococos coagulase negativo também costumam formar colônias pequenas.
- Média (até 3 mm de diâmetro) – Enterobactérias, não fermentadores e Estafilococos.
- Grandes (mais de 4 mm de diâmetro) – *Bacillus* spp, algumas enterobactérias como *Klebsiella* e *Enterobacter*, o mesmo ocorre com não fermentadores como *Pseudomonas*. Vale lembrar a formação de véu, característico do gênero *Proteus*, *Comamonas* e algumas cepas de *Pseudomonas*.

Cor

A coloração dependerá do meio de cultura utilizado.

Meios não diferenciais – pode-se identificar a coloração características de alguns microrganismos:

- *S. aureus* – amarelo
- *Micrococcus* – amarelo
- *Serratia* – avermelhado
- *Roseomonas* - róseo
- *Pseudomonas* – diferentes tons de verde e castanho
- *Enterococcus casseliflavus* – amarelo

Meios diferenciais – a coloração da colônia sofre interferência das reações que ocorrem com substratos dos meios de cultura:

- Utilização da lactose no Mac Conkey – vermelho
- Utilização da lactose no CLED – amarelo
- Utilização do manitol em Ágar manitol salgado – amarelo
- Produção de H₂S no Hecktoen Enteric e Salmonella-Shigella – negro

Hemólise

Baseada na lise de hemácias contidas no Ágar Sangue (5%)

- Lise total – denominada beta-hemólise, ocorre a formação de halo de transparência ao redor e/ou sob a colônia: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Listeria*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus*.
- Lise parcial – denominada alfa-hemólise, há formação de halo com coloração esverdeada: *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus*.
- Ausência de lise – definida como gama-hemólise, meio de cultura inalterado: *Enterococcus*, Estafilococos coagulase negativo.

Forma da colônia

- Redonda – *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, Estafilococos, Estreptococos
- Irregular – *Pseudomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Bacillus*

- Produção de véu – *Proteus, Comamonas, Pseudomonas*
- Filamentosas – fungos filamentosos
- Formando pontas, como estrelas – *Cândida*
- Com depressão no centro – Pneumococo
- Cerebriforme – *Pseudomonas stutzeri*
- Elevada – *Klebsiella, Bacillus*
- Chata – *Enterobacter, Pseudomonas*

Consistência

- Friável, quebradiça - *Moraxella*
- Mucóide – *Klebsiella, Pseudomonas, Bacillus*
- Seca – *E. coli, Citrobacter, S. aureus*
- Butirosa (manteiga) – *Candida*

Cheiro

- *Eikenella corrodens* – cheiro de cloro
- *Pseudomonas* – cheiro adocicado
- Anaeróbios – cheiro fétido

Densidade

- Opaca: *E. coli, Candida, S. aureus*
- Brilhante: *Stenotrophomonas, Pneumococo*

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E CONTAGEM

Cultura Quantitativa

- Avaliar a homogeneidade de crescimento pela placa
- Contar separadamente todas as colônias diferentes, até 300 UFC
- Para a contagem deve-se marcar com uma caneta o verso de cada unidade contada, para evitar que se conte duas vezes a mesma colônia
- Contagens maiores devem ser determinadas por estimativa
 - Dividir a placa em 4 ou 8 partes
 - Observar a homogeneidade do crescimento e contar as partes que sejam mais representativas do crescimento total
 - Contar o número de UFC da parte escolhida e multiplicar pelo total de partes
- Converter o número de UFC contadas em UFC/ml ou UFC/g, conforme o material analisado

Utilizar o fator de correção:

do volume:

- 1 µL – multiplicar por 1.000
- 10µL – multiplicar por 100
- 100µL – multiplicar por 10

e/ou diluição:

- diluição 1:10 – multiplicar por 10
- diluição 1:100 – multiplicar por 100
- diluição 1:1000 – multiplicar por 1000

Cultura Semi-quantitativa e Qualitativa

Para a maioria das culturas não se padroniza o volume do inóculo e semeia-se o swab e/ou com a alça, com a finalidade apenas de obter colônias isoladas para posterior identificação (secreções cutâneo-mucosas, fezes, etc.).

Para estes materiais o objetivo pode ser encontrar um patógeno específico entre bactérias da microbiota considerada normal na área de onde foi obtida a amostra clínica (*S. pyogenes* em orofaringe, *Salmonella* e *Shigella* em fezes, *N. gonorrhoeae* em secreção uretral, etc). Outras vezes deve-se relatar as bactérias potencialmente patogênicas e descrever a relação entre as colônias isoladas (predomínio de..., presença de... ou raras colônias de...) Ex: Cultura de ferida cirúrgica = predomínio de *S. aureus*, presença de *P. aeruginosa* e raras colônias de *E. coli*, e ignorar raras colônias de *Staphylococcus coagulase negativo*, ou de estreptococos alfa hemolíticos, corineformes, quando bactérias potencialmente patogênicas forem isoladas.

5. IDENTIFICAÇÃO

MEIOS DE CULTURA

O crescimento dos microrganismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a sua identificação. É importante conhecer o potencial de crescimento de cada meio de cultura e adequar ao perfil bacteriano esperado para cada material.

- Ágar sangue (AS) – meio rico e não seletivo, diferencial para a hemólise, nele crescem a maioria dos Gram negativo e Gram positivo, além de fungos filamentosos (bolores) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros fastidiosos
- Ágar chocolate (AC) – meio rico e não seletivo, permite o crescimento da grande maioria das bactérias aeróbias e facultativas. Quando incubado em CO₂ dá suporte também ao crescimento dos microaerófilos. Pode-se observar halos esverdeados com colônias alfa- hemolíticas
- Ágar Mac Conkey (MC) – meio seletivo para Gram negativo e diferencial para a utilização de lactose. Deve inibir o crescimento de microrganismos Gram positivo.
 - Lactose positiva – coloração avermelhada
 - Lactose negativa – coloração inalterada
 - Como exceção, eventualmente, podem crescer *Enterococcus*, *Candida* e *Bacillus*
- Ágar Salmonela-Shigella (SS) – meio seletivo para *Salmonela* e *Shigella* e diferencial para a utilização de lactose (coloração rósea) e produção de H₂S (coloração negra)
- Ágar Hecktoen Enteric (HE) - meio seletivo para *Salmonela* e *Shigella* e diferencial para a utilização de lactose (coloração alaranjada) e produção de H₂S (coloração negra)
- Ágar Thayer Martin Modificado (TMM) – meio seletivo pela adição de colistina, vancomicina e nistatina inibe crescimento de enterobactérias, Gram positivos, fungos e algumas espécies de Neisserias saprófitas. Enriquecido com a adição de complementos para a recuperação de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*

COLORAÇÃO DE GRAM

- Deve-se realizar a coloração de Gram para todas as colônias crescidas em meios não seletivos quando o aspecto deixar dúvidas quanto a sua classificação.
- Com uma agulha microbiológica estéril, pegar pequena porção de uma colônia isolada e passar para uma lâmina limpa e identificada.
- Para facilitar a leitura, pode-se homogeneizar o material com uma gota de solução salina estéril em movimentos centrífugos.
- Aguardar para que seque e fixar rapidamente sobre a chama.
- Correlação entre as principais bactérias de importância clínica e os tipos morfotinturiais:

GRAM POSITIVOS

Cocos	Cadeias longas - estreptococos aeróbios e anaeróbios
	Cachos – estafilococos e peptococos (anaeróbio).
Coco-bacilo (podem formar cadeias curtas)	Cachos e tétrades – <i>Micrococcus</i> , <i>Stomatococcus</i> , <i>Aerococcus</i> spp
	Aos pares – <i>Enterococcus</i>
	Gram variável – <i>Gardnerella</i>
	Em chama de vela – <i>S. pneumoniae</i>
	Retos e curtos – <i>Lactobacillus</i> , <i>Erisipelotrix</i> , <i>Listeria</i> , <i>Rhodococcus</i>

Bacilos	Ramificados – <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Propionibacterium</i> (anaeróbico)
	Difteróides – <i>Corynebacterium</i>
	Esporulados – <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>

GRAM NEGATIVOS

Cocos (visualizados aos pares)	<i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Branhamella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Veillonella</i> (anaeróbico)
Coco-bacilo	<i>Haemophilus</i> (pleomórfico, ora coco-bacilo, ora bacilo), <i>Brucella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Bacteróides</i> (anaeróbicos), Enterobactérias
Bacilos	Curvos – <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Vibrio</i>
	Helicoidais – <i>Arcobacter</i> e <i>Borrelia</i> . <i>Leptospira</i> e <i>Treponema</i> (não visíveis ao Gram)
	Retos – Enterobactérias, não fermentadores
	Extremidades afiladas – <i>Fusobacterium</i> (anaeróbico)
	Extremidade bifurcada – <i>Bifidobacterium</i> (anaeróbico)

ESQUEMA GERAL DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

CRESCIMENTO BACTERIANO

- Observar as características das diferentes colônias crescidas em cada meio de cultura utilizado. Lembrar que o tamanho das colônias de um mesmo agente pode ser variável, conforme a proximidade com outras colônias.
- Por exemplo, semeadura em Ágar sangue (AS) e Mac Conkey (MC):
 - Observar quantos tipos de colônia cresceram em cada ágar.
 - As colônias que cresceram somente em AS devem ser de microrganismo Gram positivo ou mais exigente.
 - Todas as colônias presentes no MC, microrganismos Gram negativo, devem apresentar correspondente no AS.
- A escolha dos meios utilizados para cada material deve estar relacionada aos agentes esperados.

Crescimento dos microrganismos nos principais meios de cultura utilizados na rotina

Mais provável	Ágar Chocolate	Ágar Sangue	CLED	Mac Conkey	Salm.- Shigella	Caldo TIO
Gram negativo, leveduras e enterococo	+	+	+	+	+	+
Gram positivo	+	+	+	neg	neg	+
Gram negativos exigentes	+	+	neg	neg	neg	neg
Haemophilus	+	neg	neg	neg	neg	neg
Anaeróbios	neg	neg	neg	neg	neg	+ *

+ Meio dá suporte ao crescimento

- Meio não dá suporte ao crescimento

* Principalmente em coluna alta

Optar entre o crescimento a ser valorizado e o que deverá ser ignorado

- Muitas vezes é impossível definir o significado clínico de um isolado sem conhecer sua identificação.
- Todo crescimento deve ser classificado como patógeno em potencial ou mero contaminante. Para tanto, deve-se reunir evidências microbiológicas, clínicas e epidemiológicas:
 - Conhecer os principais patógenos esperados para cada material biológico
 - Obter o máximo de informações sobre o quadro clínico apresentado
 - Os componentes da microbiota residente (*Micrococcus*, Estafilococos coagulase negativo, *S. viridans*...) apresentam menor valor preditivo positivo como agentes infecciosos, sendo de fácil interpretação na maioria dos casos. Entretanto, em condições específicas podem participar como agentes patogênicos. Por exemplo:
 - ✓ Duas ou mais hemoculturas periféricas com *S. viridans* podem ser consideradas como possível diagnóstico de bacteremia por este agente, devendo ser investigada a possibilidade de endocardite
 - Observar se a cultura é pura ou se existem diferentes tipo de colônias, neste caso, se há predomínio de um tipo.
 - As culturas puras apresentam maior valor preditivo positivo para diagnóstico, especialmente em sítios intensamente colonizados.
 - Por exemplo: cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Candida* em coprocultura. Entretanto, podem ocorrer também como contaminantes. Por exemplo: cultura pura de *S. viridans* em swab de orofaringe
 - Sempre que possível, deve-se traçar um paralelo entre os achados da bacterioscopia direta do material e o resultado da cultura, buscando:
 - ✓ Valorizar achados de cultura – bacterioscopia com predomínio de cocobacilos pleomórficos em BAL e isolamento de *Haemophilus* em cultura, ainda que em baixas contagens por dificuldades de crescimento
 - ✓ Definir contaminantes – presença de abundantes células epiteliais na bacterioscopia da urina não centrifugada ou em escarro, denotando a contaminação com a microbiota local
 - ✓ Detectar falhas nas condições de coleta e/ou processamento laboratorial e uso de antimicrobianos– Bacterioscopia de liquor, líquido articular ou secreção conjuntival com diplococos Gram negativo aos pares intracelulares e cultura negativa
 - ✓ Caracterização de infecção por anaeróbios – cultura negativa com bacterioscopia revelando microrganismos com características morfológicas de anaeróbios
 - ✓ Quantificação – em culturas quantitativas os achados da bacterioscopia direta devem coincidir com as contagens obtidas em cultura (urocultura, BAL, aspirado traqueal ...)

COLORAÇÃO DE GRAM DAS COLÔNIAS ISOLADAS

- Sempre que utilizar meio não seletivo.
- Quando utilizar meios seletivos e desejar confirmar a concordância entre a classificação morfotintorial e o meio utilizado.
- Para verificar a presença de leveduras, neste caso o exame direto com salina é suficiente.

DIRECIONAMENTO DA IDENTIFICAÇÃO

- De acordo com o crescimento em meio seletivo e o resultado da bacterioscopia, seguir a rotina específica.

6. MANUTENÇÃO E ESTOQUE DE CULTURAS

MANUNTENÇÃO DAS CULTURAS

PREPARO DE CULTURAS

Uma vez obtida uma cultura satisfatória, a mesma deve ser mantida pura e viável e para isso é preciso:

- transferir periodicamente a cultura em um meio de cultura adequado;
- incubar até que a cultura atinja a fase estacionária máxima de crescimento;
- e estocar em temperatura apropriada para impedir maior crescimento.

A cultura é preparada usualmente a partir de uma cultura anterior ou originalmente do estoque. Ao cultivar a cultura desejada procura-se obter uma cultura que contenha somente o microrganismo desejado, um número uniforme da população, que seja viável e que apresente resistência a condições desfavoráveis. O sucesso no preparo da cultura está também relacionado com o preparo e esterilização do meio de cultura, da inoculação e do tempo e temperatura de incubação.

A temperatura de incubação geralmente é próxima da temperatura ótima para aquela espécie. Tanto a temperatura quanto o tempo de incubação são freqüentemente ajustadas de modo que a cultura esteja pronta na hora em que ela for utilizada. Do contrário, a cultura deve ser esfriada para impedir um desenvolvimento superior ao desejado.

As culturas podem ser preservadas em tubos e então transferidas periodicamente para meios de preparo recente. Os intervalos de tempo em que são feitas as transferências variam de acordo com o microrganismo. Quando este procedimento é adotado na manutenção de uma coleção de culturas, considerar o meio próprio de cada espécie, a temperatura adequada de armazenamento e o tempo de transferência.

Observar que a transferência frequente de uma cultura instável pode levar a mudanças indesejáveis nas suas características.

PUREZA DAS CULTURAS

Para assegurar a pureza das culturas, estas devem ser obtidas periodicamente de uma cultura e verificadas regularmente quanto à pureza.

Os métodos para avaliar a pureza da cultura variam com o tipo de cultura a ser testada.

- Exame microscópico: a contaminação é indicada pela aparência e pelo número elevado dos mesmos.
- Semeadura em meio nutritivo: permite o crescimento de contaminantes.
- Testes bioquímicos: provas para presença de substâncias produzidas por contaminantes.

VIABILIDADE DA CULTURA

A viabilidade é avaliada pela taxa de crescimento e atividade metabólica. A deterioração das culturas pode resultar do manuseio incorreto, do cultivo inadequado, de transferências freqüentes por um longo período, meio de cultura impróprio, mutação e ataque da bactéria por um bacteriófago.

ESTOQUE DE CULTURAS

O estoque de culturas deve ser preparado de modo que as culturas sejam armazenadas e preservadas por um longo período sem transferência. Tais culturas tendem a permanecer estáveis e são utilizadas como fonte de cultura caso a cultura ativa seja perdida e/ou deteriorada.

As culturas podem ser estocadas pelos seguintes métodos:

- liofilização (freeze drying)
- refrigeração em $\leq - 50^{\circ}\text{C}$

- refrigeração em nitrogênio líquido (-196°C)
- vedação com parafina ou camada de óleo mineral em ágar inclinado

ESTOQUE DE CULTURAS BACTERIANAS POR ≥ 1 ANO

LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um método comum e reconhecido para preservação de microrganismo. É um método denominado também de "freeze-drying", cujo processo implica na estabilização da cultura de modo a não mais permitir atividade biológica ou reações químicas. A cultura é primeiramente congelada e em seguida a umidade presente é reduzida por *sublimação* (primeira etapa de dessecação) e por *desorção* (segunda etapa de dessecação).

Para o processo de liofilização alguns fatores influenciam na recuperação e estabilidade da população do microrganismo. Estes fatores são os seguintes:

- Fase log, estacionária e lag de um microrganismo específico semeada em meio de cultura.
- Propriedades físico-químicas do meio de cultura.
- Temperatura da fase de congelamento do microrganismo.
- A taxa de liofilização e extensão da remoção da umidade.
- O estoque de microrganismo liofilizado com relação à temperatura e exposição à umidade.
- Composição físico-química do solvente e o período de hidratação.

Obter cepas comerciais e estocá-las conforme as instruções do fabricante.

CONSERVAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA E EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

A fácil disponibilidade de refrigeradores e de tanque de refrigeração com nitrogênio líquido proporciona um outro meio de estoque de culturas. Este tipo de conservação tem sido comprovadamente satisfatório e adotado também como uma alternativa para microrganismos que não podem ser mantidos liofilizados. Neste método, as células são congeladas junto com um agente protetor como glicerol.

Preparo do meio de conservação:

- Utilizar ágar sangue de carneiro, sangue de coelho ou caldo soja tripticaseína (soybean-casein digest) esterilizado contendo 15% de glicerol; o caldo soja tripticaseína pode ser estocado a 4°C até 6 meses.
- Adicionar o meio em tubos estéreis que serão utilizados para o estoque da cultura e identificá-los.

Inoculação:

- A partir de uma cultura semeada em meio apropriado, preparar uma densa suspensão de células e agitar bem.
- Preparar um número suficiente de tubos para estoque de cepas por um ano. Mantenha dois tubos como estoque permanente.
- Resfriar a - 50°C ou abaixo. À - 50°C, as cepas podem ser mantidas por um ano. Já à -70°C ou em líquido de nitrogênio, as culturas podem ser mantidas indefinidamente. Via de regra, deve-se substituir os não fastidiosos a cada 5 anos e os fastidiosos a cada 3 anos.

Recuperação das cepas estocadas:

- Retirar o tubo do refrigerador ou do tanque de refrigeração e descongelar em água morna.
- Semear em meio sólido e não refrigerar novamente o tubo utilizado.

Modo alternativo

- Retirar o tubo e obter com a alça uma porção congelada da suspensão bacteriana
- Semear em meio sólido e retornar o tubo ao refrigerador; as cepas devem ser semeadas duas vezes antes de serem utilizadas como controles.
- Verificar anualmente a viabilidade da cultura.

CONSERVAÇÃO COM ÓLEO MINERAL

Muitas bactérias podem ser conservadas cobrindo-se o crescimento em ágar inclinado com óleo mineral estéril. O óleo deve cobrir completamente o meio alcançando 1 cm acima da extremidade do bisel. A conservação nessas condições varia conforme a espécie, mas é geralmente possível por vários anos.

A recuperação da cepa se faz removendo com uma alça parte da cultura sob o óleo e semeando-a para um meio recente.

ESTOQUE DE CULTURAS BACTERIANAS POR < 1 ANO

MEIOS COMERCIAIS

- Ágar cistina-tripticase sem carboidrato para estafilococos, estreptococos e outros fastidiosos; adicionar 1 ml de soro de cavalo estéril no meio.
- Meio com carne cozida sem glicose para anaeróbios e anaeróbios facultativos; armazenar em temperatura ambiente.
- Ágar soja tripticaseína para fastidiosos
- Ágar sangue e ágar chocolate inclinado para estreptococos fatidiosos e *Haemophilus* spp; armazenar até duas semanas.

INOCLULAÇÃO

- Identificar os tubos.
- Inocular com uma cepa cultivada no respectivo meio.
- Incubar overnight, vedar e armazenar em temperatura ambiente ou 5°C.

RECUPERAÇÃO DAS CEPAS ESTOCADAS

- Retirar parte da cultura contida no tubo e semear em meio sólido.
- Incubar overnight.
- Preparar novos estoques o quanto necessário ou por 6 meses.

Alguns exemplos de exigências para a preservação de algumas espécies de bactérias.

Bactéria	Meio	Intervalo	Temperatura de incubação	Temperatura de estocagem
<i>Neisseria</i> spp.	Ágar cistina-tripticase	1 mês	35°C	35°C
<i>Bacillus</i> spp.	Ágar nutritivo	12 meses	28°C	10°C
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ágar nutritivo	3 meses	28°C	10°C
<i>Clostridium</i> spp.	Meio com carne cozida	6 meses ou mais	28°C	ambiente
<i>Mycobacterium</i> spp.	Ágar glicerina	4 meses	30°C	10°C

ESTOQUE DE MICOBACTÉRIAS POR ≥ 1 ANO

CONSERVAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA

- Semear a micobactéria em caldo Middlebrook e colocar em tubos indentificados.
- Ou suspender a cultura em leite desnatado ou caldo brucella com 15% de glicerol.
- Para ambas alternativas, armazenar a -70°C.

- Para recuperação da cepa:
 - descongelar rapidamente em banho-maria a 37°C.
 - a suspensão estoque pode ser descongelada e novamente refrigerada várias vezes sem perda da viabilidade das células.

CONSERVAÇÃO A 4°C

- Semear a espécie em ágar inclinado à base de ovo.
- Armazenar a 4°C até 1 ano.

ESTOQUE DE MICOBACTÉRIAS POR < 6 MESES

- Semear a espécie em ágar inclinado à base de ovo.
- Armazenar em temperatura ambiente no escuro até 6 meses.

ESTOQUE DE CULTURA DE FUNGOS POR ≥ 1 ANO

CONSERVAÇÃO DA CULTURA EM ÁGUA

É o método mais simples e confiável:

- Adicionar 2 a 3 ml de água esterilizada sobre esporos viáveis semeados em ágar inclinado de batata dextrose.
- Suspende cuidadosamente no próprio tubo a conídia sem machucar o meio de cultura.
- Remover a suspensão e coloca-la em um tubo estéril.
- Fechar o tubo firmemente e identificá-lo adequadamente.
- Armazenar em temperatura ambiente; o microrganismo pode permanecer viável por vários anos.
- Para a recuperação da espécie:
 - agitar bem o tubo e inocular uma gota em ágar batata dextrose.

CONSERVAÇÃO COM ÓLEO MINERAL

- Cubrir completamente a cultura semeada em ágar inclinado de batata dextrose com óleo mineral estéril.
- Vedar o tubo firmemente e identificá-lo.
- Incubar em temperatura ambiente.
- Para a recuperação da cultura:
 - passar na chama o tubo;
 - obter parte do crescimento com a alça estéril;
 - escoar o óleo;
 - inocular em caldo Sabouraud ou ágar inclinado;
 - incubar 30°C até o obter o crescimento da cultura.

CONSERVAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA

- Congelar a -70°C esporos viáveis semeados em ágar inclinado de batata dextrose; o tubo deve ser de boa qualidade, senão o mesmo pode quebrar.
- Para a recuperação da cultura:
 - retirar do refrigerador;
 - Remover imediatamente parte do crescimento do ágar;
 - inocular em ágar batata dextrose;
 - retornar o tubo original (estoque) ao refrigerador; caso descongele, preparar uma nova cultura.

ESTOQUE DE CULTURA DE FUNGOS POR < 6 MESES

- Armazenar a 4°C cultura de esporos viáveis semeados em ágar batata dextrose até seis meses; os fastidiosos necessitam ser transferidos para meio de preparo recente mais freqüentemente.
- Atenção ao fato de que a transferência freqüente resulta em culturas atípicas e inativas.

COLEÇÕES DE CULTURA

Em todo mundo há organizações que mantêm culturas puras autênticas de microrganismos. Estas estão disponíveis para diversas finalidades e assim desempenham um papel fundamental para os microbiologistas tanto nos serviços prestados quanto nas pesquisas experimentais.

Para informações sobre coleções de cultura no mundo e os respectivos países registrados no WDCM (World Data Center for Microorganism), acessar – www.wdcm.nig.ac.jp/hpcc.html

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ballows, A.J., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. **Manual of clinical microbiology**, 5 th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
2. Baron, F.J., and Tenover, F.C. **Diagnostic Microbiology**, 8 th ed., CV Mosby, St. Louis, 1990.
3. Bartlett, J.G., Ruan, K.J., Smith, T.F. and Wilson, W.R. **Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections**. CUMITECH 7A, Coordinating ed., J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
4. Clarridge, J.E., Pezzlo, M.T. and Vosti, K.L. **Laboratory Diagnosis of urinary tract infections**. CUMITECH 2A, Coordinating ed., A.S. Weissfeld, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
5. Forbes, B.A. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 10th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1998.
6. Gilligan, P.H., Janda, J.M., Karmali, M.A and Miller, J.M. **Laboratory Diagnosis of Bacterial Diarrhea**. CUMITECH 12A, Coordinating ed., F.S. Nolte. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
7. Isenberg, H.D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
8. Isenberg, H.D. **Essential procedures for Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
9. Isenberg, H.D., Schoenknecht, F.D. and A. VON. G., **Collection and processing of bacteriological specimens**. CUMITECH 9, Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1979.
10. Koneman, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**, 5th ed., Lippincot, Philadelphia, 1997.
11. Miller, J.M. **A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1996.
12. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle da infecção hospitalar**. Brasília, 1991.
13. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
14. NCCLS. **Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals**, 2nd. Ed., Approved Guide-line. NCCLS document GP2-A2 (ISBN 1-56238-156-3) NCCLS, Villanova, 1992.
15. Reller, L.B., MURRAY, P.R. and Mac Lowry, J.D. **Blood Cultures II**. CUMITECH 1A, Coordinating ed., J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982.
16. Rodloff, A.C., Appelbaum, P.C. and Zabransky, R.F., **Practical Anaerobic Bacteriology**. CUMITECH 5A, Coordinating ed., A.C. Rodloff, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.

Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos

Módulo IV

ÍNDICE

1. Introdução	1
Procedimentos gerais	1
2. Meios de cultura para transporte e conservação	2
Cary Blair	2
Salina Tamponada	2
Meio Stuart	3
Ágar nutriente	4
3. Meios para crescimento e isolamento	6
Ágar Chocolate	6
Ágar Thayer-Martin Chocolate	7
Ágar Salmonella-Shigella (ss)	7
Caldo Selenito	8
Caldo Tetracionato	9
Caldo Tioglicolato com indicador	10
Caldo Tioglicolato sem indicador	11
Ágar Mac Conkey	12
Ágar Sangue	13
Ágar CLED – cystine lactose electrolyte deficient	14
Caldo BHI – brain heart infusion	15
Löwenstein Jensen	16
Meio bifásico: Löwenstein e Middlebrook	18
Ágar Mycosel	19
Ágar Sabouraud	20
4. Meios comerciais para provas de identificação	22
Base de nitrogênio para leveduras – Yeast Nitrogen Base	22
Ágar Citrato Simmons	23
Ágar BÍlis-Esculina	24
Ágar Sangue - CAMP	25
Caldo base de Moeller	26
Ágar Dnase	28
Ágar Esculina	30
Ágar Fenilalanina	31
CTA – Cystine Tryticase Agar	32
Caldo Triptona e SIM	33
Meio Caldo Triptona	34
Caldo Malonato	35
Caldo Nitrato	36
Meio base para oxidação e fermentação - OF	38
Ágar TSI – triplo açúcar ferro	40
Ágar base uréia (christensen)	41
5. Fórmulas e produtos para provas de identificação	43
Para prova de catalase	43
Para prova de coagulase	43
Para prova de gelatinase	45
Para prova de lecitinase	46
Para prova de oxidase	47
Para fermentação de carboidratos	48
Para a prova de hidrólise	49
Para crescimento a 42 e 44°C	50
Para teste de motilidade	51
Para prova de tolerância ao NaCl 6,5%	55
6. Discos para identificação	57
Bacitracina	57
Novobiocina	57
Optoquina	58
7. Meios para teste de sensibilidade aos antimicrobianos	60
HTM – haemophilus test médium	60
Ágar Mueller Hinton	61
Ágar Mueller Hinton Sangue	62
8. Referências bibliográficas	64

1. INTRODUÇÃO

PROCEDIMENTOS GERAIS

PREPARAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

- Os meios comerciais devem ser hidratados em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
- Os meios preparados não comerciais, devem ser pesados separadamente em papel manteiga ou papel alumínio e adicionados em um único frasco (normalmente em béquer), hidratar em pequena quantidade de água até que todo o meio fique úmido e só depois deve-se acrescentar o restante da água.
- Sempre que for necessário levar o meio para fundir, usar vidro Pyrex, aquecer sobre a tela de amianto ou similar e tripé, no bico de Bunsen.
- Usar sempre luvas térmicas apropriadas para laboratório para manipular vidrarias quentes;
- Sempre que for usado o termo "*esterilizar em autoclave*", o tempo de esterilização é de 15 minutos e a temperatura de 121°C.
- Sempre que for usado o termo "*esterilizar por filtração*", usar o filtro com porosidade de 0,22 micra, recomendado para partículas bacterianas.
- Quando distribuir o meio antes de autoclavar, os tubos não precisam estar esterilizados;
- Quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis.
- Os meios devem ser autoclavados com as tampas semi-abertas, para que a esterilização seja por igual em todo o conteúdo dos tubos - tampas fechadas não permitem a entrada do vapor.

CONTROLE DE QUALIDADE DE ESTERILIDADE E CRESCIMENTO

- Para todos os meios confeccionados, colocar no mínimo 10% do lote preparado na estufa 35 ± 1°C por 24 horas para o controle de esterilidade.
- Não deve haver mudança de cor nem crescimento de qualquer colônia.
- Para o controle de crescimento, sempre que possível usar cepas ATCC®, que são cepas de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização.
- Se não for possível o uso de cepas ATCC®, usar cepas 100% positivas para os controles de qualidade de crescimento realizados.

RECOMENDAÇÕES GERAIS

- Evitar usar meios vencidos (liofilizados e prontos para uso); se usar, certificar-se com o controle de crescimento de que realmente está funcionando.
- Não usar meios prontos para uso em tubos ou placas que estejam ressecados.
- Observar com atenção para as instruções de alguns inóculos que são específicos para alguns meios de cultura.
- Recomenda-se o uso de tubos com tampa de rosca, pois evitam o ressecamento rápido do meio (tamanho dos tubos utilizados geralmente são de 11 por 100 mm).
- As placas de Petri são de 50, 90 ou 150 mm de diâmetro.
- Todos os meios confeccionados devem ser devidamente identificados com o nome, data de fabricação, data de validade e tipo de armazenamento.
- Todos os meios de placa devem ser embalados em filme plástico PVC transparente para evitar o ressecamento.
- Evitar o uso de sacos plásticos para embalar as placas, pois a água de condensação formada facilita a proliferação de fungos; para meios de cultura em tubos, colocar em sacos plásticos, procurando tirar o excesso de ar.

2. MEIOS DE CULTURA PARA TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO

CARY BLAIR

PRINCÍPIO

- meio de Cary Blair foi formulado à partir do meio de Stuart, uma vez que microrganismos patogênicos e outros coliformes fecais sobrevivem bem neste meio.
- A carência de uma fonte de nitrogênio impede consideravelmente a multiplicação de microrganismos e a composição nutritiva garante a sobrevivência deles.
- O que difere este meio do meio de Stuart, é a adição de uma solução salina balanceada de tampão fosfato inorgânico e omitindo da fórmula o azul de metileno.

UTILIDADE

- Transporte de material fecal e conseqüente conservação dos microrganismos.

FÓRMULA/ PRODUTO

- Meios comercial: Meio de transporte Cary Blair.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Fundir completamente;
- Distribuir 7 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave;
- Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para solidificar.
- pH: 7,4 +/- 0,2

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom (com 0, 24 e 48 horas de crescimento): *Shigella flexneri* ATCC 12022.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C de 6 a 8 semanas.

INOCULAÇÃO

- Introduzir um "swab" estéril de madeira nas fezes recém coletadas;
- Após a coleta, introduzir imediatamente o "swab" no meio de cultura e quebrar a ponta da haste, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura;
- Fechar o tubo;
- Manter em temperatura ambiente até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: Branco opalescente.
- Como este é um meio de transporte, não há evidência de crescimento bacteriano.

RECOMENDAÇÕES

- Não deixar o meio com a tampa aberta ou semi aberta após a semeadura.
- Não semear fezes coletadas com mais de 6 horas.

SALINA TAMPONADA

PRINCÍPIO

- Meio líquido tamponado que mantém a bactéria viável.

UTILIDADE

- Meio de transporte de fezes.

FÓRMULA / PRODUTO

- Fórmula:
 - NaCl 4,2 g
 - Fosfato dipotássico anidro 3,1 g
 - Glicerina bidestilada 300 ml
 - Água destilada 700 ml

PROCEDIMENTOS

- Distribuir 10 ml em cada tubo de 16 x 160 mm;
- Esterilizar em autoclave.

CONTROLE DE QUALIDADE

- *Shigella flexneri* ATCC 12022

INOCULAÇÃO

- Inocular 2 g da amostra de fezes e homogeneizar;
- Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 12 a 18 horas.

INTERPRETAÇÃO

- O crescimento é indicado pela turbidez do meio.
- Após incubação semear 3 a 4 alçadas da amostra em uma placa de SS e/ou MacConkey.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 8°C por até 3 meses.

MEIO STUART

PRINCÍPIO

- A carência de uma fonte de nitrogênio impede consideravelmente a multiplicação de microorganismos e a composição nutritiva garante a sobrevivência deles.

UTILIDADE

- Transporte de diversos materiais e conseqüente conservação dos microorganismos.
- Conservação de microorganismos patogênicos como: *Haemophilus* spp., *Pneumococcus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. entre outros.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meios comercial: Meio de transporte STUART

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Fundir completamente;
- Distribuir 7 ml por tubo;

- Esterilizar em autoclave;
- Após retirar da autoclave, manter os tubos em posição vertical para que solidifiquem.
- pH: 7,4 +/- 0,2

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom (com 0, 24 e 48 horas de crescimento):

Haemophilus influenzae ATCC 10211
Shigella flexneri ATCC 12022
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Bordetella pertussis ATCC 9340

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por 1 a 2 semanas.

INOCULAÇÃO

- O material biológico deve ser coletado com auxílio de um "swab" estéril com haste de madeira;
- Após a coleta, introduzir imediatamente o "swab" no meio de cultura e quebrar a ponta da haste, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura;
- Fechar o tubo;
- Manter em temperatura ambiente até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: Branco opalescente.
- Como este é um meio de transporte, não há evidência de crescimento bacteriano.

RECOMENDAÇÕES

- Não deixar o meio com a tampa aberta ou semi aberta após a semeadura.

ÁGAR NUTRIENTE

PRINCÍPIO

- O Nutriente Ágar é um meio relativamente simples, de fácil preparação e barato, muito usado nos procedimentos do laboratório de Microbiologia.

UTILIDADE

- nutriente ágar tem várias aplicações no laboratório de Microbiologia, e pode ser utilizado para análise de água, alimentos e leite como meio para cultivo preliminar das amostras submetidas à exames bacteriológicos e isolamento de organismos para culturas puras.
- uso mais freqüente é para a conservação e manutenção de culturas em temperatura ambiente neste ágar, como método opcional para os laboratórios que não dispõem do método da criopreservação (congelamento das cepas em freezer à - 70°C).
- Usado para observar esporulação de espécies de bacilos Gram positivos.

FÓRMULA / PRODUTO

- Produto: Nutriente Ágar
- Fórmula:

- Extrato de carne	3 g
- Peptona	5 g
- Ágar ágar	15 g
- Água destilada	1000 ml
- pH: 6,8 +/- 0,2	

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar os componentes;
- Fundir;
- Distribuir 3 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave;
- Após retirar da autoclave, inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de "bico de flauta" (ângulo de 45°).

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente:
Escherichia coli ATCC 25922
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Estriar a superfície inclinada do meio;
- Incubar.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: branco opalescente
- Positivo: Crescimento na superfície do ágar;
- Negativo: Ausência de crescimento.

RECOMENDAÇÕES

- Usar tubos com tampa de rosca para evitar ressecamento do ágar.
- Repicar as cepas conservadas a cada 3 meses.
- Conservar as cepas após o crescimento no meio em temperatura ambiente.
- Por ser um meio nutritivo, a ausência de crescimento não deverá ocorrer.

3. MEIOS PARA CRESCIMENTO E ISOLAMENTO

ÁGAR CHOCOLATE

PRINCÍPIO

- Meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, embora cresçam neste meio quase todos os tipos de microrganismos.
- À base do meio, é adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho em temperatura alta, o que faz com que as hemácias lise, liberando hemina e hematina, compostos fundamentais para o crescimento dos microrganismos exigentes.

Observação: se utilizar sangue de carneiro ou coelho no lugar do sangue de cavalo, adicionar os suplementos a base de NAD (coenzima I) e cisteína após resfriar a base achocolatada à aproximadamente 50°C.

UTILIDADE

- Crescimento de microrganismos exigentes *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella* spp.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meios comerciais: BHI Ágar *, Columbia Ágar Base, Blood Ágar Base, Mueller Hinton Ágar.
- Sangue de cavalo, carneiro ou coelho desfibrinado.
- Recomenda-se o uso da base de BHI Ágar, por apresentar melhor crescimento das cepas exigentes, principalmente cepas de *Haemophilus* spp.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Esterilizar em autoclave;
- Esfriar a base à temperatura de aproximadamente 80°C;
- Adicionar 5 ml de sangue desfibrinado de cavalo para cada 100 ml de base;
- Homogeneizar bem até lisar totalmente as hemácias e o meio apresentar uma cor castanho escuro (chocolate);
- Distribuir em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente: *Haemophilus influenzae* ATCC 10211.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C por 4 meses.

INOCULAÇÃO

- Estriar a superfície do meio, usando a técnica de semeadura para isolamento;
- Incubar a 35°C por 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: castanho escuro (chocolate).
- Colônias de tamanho pequeno a médio, com pigmento amarelo: sugestivo de *Neisseria* spp, *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella* spp.
- Colônias pequenas e delicadas, com pigmento creme claro: sugestivo de *Haemophilus* spp.

RECOMENDAÇÕES

- Lembrar que é um meio rico e crescem vários tipos de microrganismos.

- Fazer esfregaço de todas as colônias suspeitas e corar pela técnica de Gram, para confirmar se trata-se ou não de *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella* spp. (cocos Gram negativos reniformes) ou *Haemophilus* spp. (bacilos Gram negativos delicados e pleomórficos).
- Não usar sangue de cavalo vencido.
- Por ser um meio rico, o crescimento a partir de materiais biológicos em geral costuma ser abundante. Sempre que necessário, isolar a colônia em estudo para os procedimentos de identificação, para não correr o risco de trabalhar com cepas misturadas.

ÁGAR THAYER-MARTIN CHOCOLATE

PRINCÍPIO

- É um meio rico e superior a outros meios de cultivo destinados para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, pois contém em sua fórmula antibióticos que inibem o crescimento de *Neisserias* saprófitas e outras bactérias, quando em amostras colhidas de sítios contaminados.

UTILIDADE

- Usado para o isolamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, a partir do material de investigação.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Thayer-Martin Ágar Base.
- Sangue desfibrinado de carneiro.
- Suplemento I: mistura de inibidores (antibióticos).
- Suplemento II: mistura de fatores de crescimento.

PROCEDIMENTOS

- Dissolver os suplementos liofilizados conforme instruções do fabricante (normalmente em água destilada estéril que já acompanha o kit) e reservar;
- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante (normalmente prepara-se 200 ml de base para cada frasco de suplementos I e II);
- Esterilizar em autoclave;
- Esfriar a base a 80°C;
- Adicionar 5 ml de sangue desfibrinado de carneiro para cada 100 ml de base;
- Homogeneizar bem até lisar totalmente as hemácias e o meio apresentar uma cor castanho escura (chocolate);
- Deixar resfriar a base a 50°C;
- Adicionar asepticamente à base resfriada os suplementos previamente dissolvidos;
- Homogeneizar delicadamente para não formar bolhas;
- Distribuir em placas de Petri de 90 mm ou 4 ml por tubos e inclinar para a superfície ficar em forma de "bico de flauta" (ângulo de 45°).

ÁGAR SALMONELLA-SHIGELLA (SS)

PRINCÍPIO

- Ágar SS possui componentes (sais de bile, verde brilhante e citrato de sódio) que inibem microrganismos Gram positivos.
- A incorporação de lactose ao meio permite diferenciar se o microrganismo é lactose positiva (bactérias que fermentam a lactose produzem ácido que na presença do indicador vermelho neutro resultando na formação de colônias de cor rosa), e bactérias que não fermentam a lactose formam colônias transparentes.
- Tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção de H₂S evidenciado por formação de colônias de cor negra no centro.

UTILIDADE

- Selecionar e isolar espécies de *Salmonella* e *Shigella*, em amostras de fezes, alimentos e água.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Ágar SS.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer o meio até fundir o ágar;
- **Não autoclavar**;
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 ml em placas de Petri 90 mm estéreis;
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

INOCULAÇÃO

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas;
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: vermelho alaranjado.
- Colônias com centro negro (H₂S) ou colônias incolores: suspeita de *Salmonella*.
- Colônias incolores: suspeita de *Shigella* spp.
- Colônias cor de rosa ou vermelho: suspeita de *Escherichia coli* ou *Klebsiella* spp.
- As bactérias não fermentadoras de lactose são incolores.
- As bactérias fermentadoras de lactose aparecem na cor rosa.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por 3 meses.

RECOMENDAÇÕES

- Ausência de crescimento ou crescimento escasso, reincubar a placa mais 24 horas.
- Não autoclavar, pois a alta temperatura degrada o açúcar contido no meio.

CALDO SELENITO

PRINCÍPIO

- Tem propriedades que inibem coliformes e outras espécies da flora intestinal como estreptococos.

UTILIDADE

- Utilizado para o enriquecimento e isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em amostras de fezes, urina e alimentos.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Selenito
- Novobiocina

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer até levantar fervura, homogeneizando de vez em quando;
- **Não autoclavar**;
- Aguardar esfriar e adicionar 0,04 g de novobiocina por litro de meio (novobiocina inibe o véu de *Proteus* spp.);
- Distribuir 7 ml em tubos estéreis de 15x150 mm com tampa de rosca.

CONTROLE DE QUALIDADE

Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 na escala 0,5 de Mac Farland;
 - Semear 0,01 ml da suspensão na placa de SS;
 - Incubar a placa a 35 ±1°C por 12 a 18 horas.
- Positivo: crescimento da *Salmonella typhimurium*.
- Negativo: não á crescimento de *Escherichia coli*.

INOCULAÇÃO

- Inocular 3 a 4 alçadas da amostra de fezes no meio de cultura;
- Incubar a 35±1°C por 12 a 18 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: vermelho tijolo.
- Após incubação, semear com o auxílio de uma alça bacteriológica em meios seletivos e enriquecidos (SS, Mac Conkey, XLD, Hectoen).

CALDO TETRATIONATO

PRINCÍPIO

- Os sais de bile contidos no meio de tetrionato inibem microrganismos Gram positivos e a adição da solução de iodo inibe a flora intestinal normal de espécies fecais.

UTILIDADE

- Meio de enriquecimento para *Salmonella* spp.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Caldo Tetrionato.
- **Solução de Iodo para tetrionato:** para ser adicionado no caldo antes de semeada a amostra de fezes.

- Iodo metálico	6,0 g
- Iodeto de potássio	5,0 g
- Água destilada	20,0 ml

PROCEDIMENTOS

Caldo tetrionato

- Pesar e hidratar o meio segundo instruções do fabricante;
- Aquecer até ferver;
- Distribuir 10 ml em tubos estéreis com tampa de rosca;
- Não autoclavar.

Solução de iodeto de potássio

- Macerar o iodeto de potássio e o iodo em um graal;
- Adicionar água aos poucos até dissolver completamente;
- Colocar em frasco âmbar.

CONTROLE DE QUALIDADE

Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 na escala 0,5 de Mac Farland;
- Semear 0,01 ml da suspensão em uma placa de SS;
- Se houver crescimento de *Salmonella* e inibição de *Escherichia coli*, liberar o lote para uso.

INOCULAÇÃO

- Adicionar 0,2 ml da solução de iodo no tubo;
- Inocular 1 a 3 g da amostra de fezes e homogeneizar vigorosamente;
- Incubar a 35 ±1°C por 12 a 18 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: límpido com precipitado branco.
- O crescimento é indicado pela turbidez do meio.
- Após incubação, semear 3 a 4 alçadas da amostra em uma placa de SS e/ou Mac Conkey.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- **Tetrationato:** Conservar de 4 a 8°C por até 4 meses.
- **Solução de iodo:** Conservar em frasco âmbar a temperatura ambiente por até 12 meses.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Neisseria gonorrhoeae* 43069 e *Neisseria meningitidis* 13090.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Usar a técnica de semeadura por esgotamento;
- Incubar em CO₂ e umidade (jarra com vela acesa e um chumaço de algodão embebido em água);
- Incubação por 48 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: castanho escuro (chocolate).
- Colônias pequenas com pigmento creme: sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*.
- Fazer esfregaço de todas as colônias suspeitas e corar pela técnica de Gram, para confirmar se trata-se ou não de *Neisseria* (diplococos Gram negativos reniformes).
- Confirmando a morfologia pelo Gram, seguir identificação com testes de oxidase e provas de fermentação.

RECOMENDAÇÕES

- Antes de semear o material biológico aquecer o meio de cultura em estufa à 35°C, pois temperaturas baixas podem inibir o crescimento de *Neisserias*;
- Não usar meio, suplementos e sangue vencidos;
- Se não for incubado em CO₂ e não houver crescimento, pode ser um resultado falso - negativo, pois as *Neisserias* necessitam de atmosfera com o CO₂ para o crescimento;
- Se não houver crescimento, incubar até 5 dias.

CALDO TIOGLICOLATO COM INDICADOR

PRINCÍPIO

- O meio de Tioglicolato dá suporte para o crescimento de vários microrganismos. O potencial de oxidação e redução baixo do meio neutraliza efeitos antibacterianos das espécies preservadas com mercúrio.
- A resazurina e o azul de metileno são indicadores da posição de oxidação de aeróbios e a dextrose incluída na fórmula é para os microrganismos que tem crescimento vigoroso na presença do carboidrato.

UTILIDADE

- Usado para o cultivo de microrganismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios.
- Usado para controle de esterilidade bacteriana de diversos materiais.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Tioglicolato caldo com indicador

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer em bico de Bunsen, até dissolver completamente;
- Distribuir 5 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.
- pH: 7,2 +/- 0,2

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Temperatura ambiente: 3 meses.
- Entre 4 a 8°C: 6 meses.

INOCULAÇÃO

- Com auxílio da alça bacteriológica, inocular o material biológico introduzindo a alça até a metade do tubo;
- Retirar a alça sem agitar o tubo;
- Incubar à 35 +/- 1°C por 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original: amarelo claro.
- Presença de crescimento: turvação do meio.
- Ausência de crescimento: meio permanece inalterado.
- Crescimento de microrganismos anaeróbios: crescimento na profundidade do meio.
- Crescimento de microrganismos aeróbios: crescimento na superfície do meio.

RECOMENDAÇÕES

- Não usar o meio quando estiver com cor rosa ou esverdeado na superfície, pois indica a presença de oxigênio no meio.
- Recomenda-se o uso do meio recém preparado, porém, se não houver a presença de oxigênio, pode-se usar um período maior.
- Não usar meios que estejam turvos.
- Não utilizar o meio quando o indicador atingir a metade do volume do meio.

CALDO TIOGLICOLATO SEM INDICADOR

PRINCÍPIO

- As substâncias redutoras tioglicolato, cisteína e sulfito de sódio produzem uma anaerobiose suficiente para microrganismos anaeróbios exigentes.

UTILIDADE

- Usado para o cultivo de microrganismos anaeróbios.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Tioglicolato caldo sem indicador.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer em bico de Bunsen, até dissolver completamente;
- Distribuir 5 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.
- pH: 7,2 +/- 0,2

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente: *Clostridium perfringens* ATCC 10543.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Temperatura ambiente: 18 meses.

INOCULAÇÃO

- Com auxílio da alça bacteriológica, inocular o material biológico introduzindo a alça até o fundo do tubo;
- Retirar a alça sem agitar o tubo;
- Incubar à 35 +/- 1°C em jarra com gerador de anaerobiose durante 48 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original: amarelo claro.
- Presença de crescimento: turvação do meio.
- Ausência de crescimento: meio permanece inalterado.

RECOMENDAÇÕES

- Não usar meios que estejam turvos.
- Se necessário, incubar um período superior à 48 horas.

ÁGAR MAC CONKEY

PRINCÍPIO

- O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos especialmente enterococos e estafilococos.
- A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram negativos como, por exemplo, o ágar SS.

UTILIDADE

- Isolar bacilos Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Ágar MacConkey.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação até fundir o ágar completamente;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 ml em placas de Petri 90 mm estéreis;
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Proteus mirabilis* ATCC 12453 (não fermentador de lactose).
- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (fermentador de lactose).
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

INOCULAÇÃO

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas;
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: rosa avermelhado.
- Crescimento de bacilos Gram negativos.
- Colônias cor de rosa: fermentadoras de lactose.
- Colônias incolores: não fermentadoras de lactose.
- Não há crescimento de cocos Gram positivos.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar as placas embaladas de 4 a 8°C por até 3 meses.

ÁGAR SANGUE

PRINCÍPIO

- O meio de Ágar sangue, usando uma base rica como abaixo descrita, oferece ótimas condições de crescimento a maioria dos microrganismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorecem a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

UTILIDADE

- Usado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos.
- Verificação de hemólise dos *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.
- Usado na prova de satelitismo (para identificação presuntiva de *Haemophilus* spp.).

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Blood Ágar Base, Columbia Ágar Base, BHI Ágar, Mueller Hinton Ágar;
- Sangue desfibrinado de carneiro ou coelho:
 - 5 ml para cada 100 ml de meio base.
 - pH: 6,8 +/- 0,2

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;

- Esterilizar em autoclave;
- Esfriar a base à +/- 50°C;
- Adicionar 5 ml de sangue desfibrinado de carneiro para cada 100 ml de base;
- Homogeneizar delicadamente para não formar bolhas;
- Distribuir em placas de Petri de 90 mm de diâmetro.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Hemólise beta hemolítica: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 ou *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Hemólise alfa hemolítica: *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.
- Hemólise gama (sem hemólise): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C por 4 meses.

INOCULAÇÃO

- Estriar a superfície do meio, usando a técnica de semeadura para isolamento;
- No final da semeadura, picar o meio com a alça para verificar hemólise em profundidade;
- Incubar à 35°C 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: vermelho.
- Beta hemólise: presença de halo transparente ao redor das colônias semeadas (lise total dos eritrócitos).
- Alfa hemólise: presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos).
- Gama hemólise (sem hemólise): ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros).

RECOMENDAÇÕES

- Não usar sangue de carneiro vencido, pois o meio fica hemolisado ou com cor muito escura, dificultando o estudo de hemólise;
- Não usar sangue humano, pois alguns microrganismos não apresentam hemólise;
- Não adicionar o sangue na base do meio quente, pois as hemácias rompem-se, dificultando o estudo de hemólise;

Por ser um meio rico, o crescimento a partir de materiais biológicos em geral costuma ser abundante, sempre que necessário, isolar a colônia em estudo para os procedimentos de identificação, para não correr o risco de trabalhar com cepas misturadas.

ÁGAR CLED – CYSTINE LACTOSE ELECTROLYTE DEFICIENT

PRINCÍPIO

- Usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras urina. A deficiência de eletrólitos inibe o véu de cepas de *Proteus*.

UTILIDADE

- Isolar e quantificar microrganismos Gram positivos, Gram negativos e leveduras.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Ágar Cled.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir de 20 a 25 ml em placas de Petri 90 mm estéreis;
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo:
 - Lactose positiva: *Escherichia coli* ATCC 25922: crescimento moderado a denso, colônias médias ou grandes amareladas, após 48 horas de incubação.
 - Lactose negativa: *Proteus vulgaris* ATCC 8427: crescimento moderado a denso, colônias azuis translúcidas.
- Negativo: ausência de crescimento

INOCULAÇÃO

- Verificar técnica de semeadura quantitativa.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: azul claro.
- Colônias lactose positiva: cor amarela.
- Colônias lactose negativa: cor azul.

Características de crescimento:

- *Escherichia coli*: colônias opacas, amarelas com ligeira cor amarelo escuro no centro, com cerca de 1,25 mm de diâmetro, as não fermentadoras de lactose colônias azuis
- Espécies de *Klebsiella*: colônias muito mucosas, cor variável de amarelo a branco azulado
- Espécies de *Proteus*: colônias azul translúcidas, geralmente menor que *E.coli*
- Espécies de *Salmonella*: colônias planas, cor azul
- *Enterococcus faecalis*: colônias amarelas, com cerca de 0,5 mm de diâmetro
- *Staphylococcus aureus*: colônias amarelas, com cerca de 0,75 mm de diâmetro
- *Staphylococcus coagulase negativa*: colônias amarelo palha e brancas
- *Corynebacterium*: colônias pequenas e cinza
- *Lactobacilos*: colônias pequenas e com superfície rugosa
- *Pseudomonas aeruginosa*: colônias verdes, com superfície prateada e periferia rugosa

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

RECOMENDAÇÕES

- Organismos que fermentam lactose baixam o pH e mudam a cor do meio de verde para amarelo, podendo assim verificar se o microrganismo é lactose negativa ou positiva;
- Espécies de *Shigella* não crescem em meios deficientes em eletrólitos.

CALDO BHI – BRAIN HEART INFUSION

PRINCÍPIO

- É um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose.
- A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas.

- A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação.

UTILIDADE

- Meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.
- Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, para realização de teste de coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano a 42 e 44°C e para teste de motilidade em lâmina.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Caldo BHI (infusão de cérebro e coração).

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Distribuir 3,0 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 e *Candida albicans* ATCC 10231.
- Negativo: meio sem inocular.

INOCULAÇÃO

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular a colônia ou o material a ser testado - realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas;
- Incubar a 35°C ±2 por 24 a 48 horas;
- Para isolamento de fungos incubar por até 5 dias.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo claro, límpido.
- Positivo: presença de turvação = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C por 6 meses.

RECOMENDAÇÕES

- Para cultivo de anaeróbios, acrescentar 0,1% de ágar.
- Para crescimento de *Haemophilus* e outros fastidiosos é necessário adição de suplementos a base de L-cisteína, NAD (fator V) e hemina (fator X).

LÖWENSTEIN JENSEN

PRINCÍPIO

- A base do meio é constituída por ovos integrais, o que permite amplo crescimento das micobactérias e o crescimento é satisfatório para o teste de niacina (que é positivo para *Mycobacterium tuberculosis*).

UTILIDADE

- Isolamento primário das micobactérias.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Meio TB para Bacilos de Koch Seg. Löwenstein Jensen ou Löwenstein Medium Base
- Ovos de galinha frescos

Meio base - fórmula:

Fosfato monopotássico	1,2 g
Sulfato de magnésio	0,12 g
Citrato de magnésio	0,3 g
L-asparagina	1,8 g
Fécula de batata	15,0 g
Glicerol	6,0 ml
Ovos totais	500 ml
Solução de Verde de malaquita a 2%	10 ml

Solução de Verde de malaquita à 2% - Fórmula:

Verde de malaquita	2 g
Água destilada	100 ml

PROCEDIMENTOS

Preparação dos ovos:

- Escovar os ovos, um a um, com escova de cerdas macias;
- Deixar os ovos submersos em água e detergente comum, durante 30 minutos;
- Enxaguar com água corrente cuidadosamente um a um;
- Deixar os ovos submersos em álcool etílico a 70% durante 30 minutos;
- Retirar os ovos cuidadosamente e secar com pano estéril;
- Reservar os ovos.

Solução de Verde de malaquita a 2%:

- Pesar o verde de malaquita e adicionar a água;
- Homogeneizar bem até dissolver o corante;
- Esterilizar em vapor fluente durante 30 minutos;
- Reservar a solução.

Meio comercial:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Adicionar o glicerol e aquecer o meio, agitando constantemente até ferver;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar a base à 45 - 50°C;
- Quebrar os ovos, um a um, cuidadosamente em copo de béquer estéril e transferir, um a um, para uma proveta estéril de 500 ml;
- Completar a proveta com ovos até completar 500 ml;
- Transferir os ovos para um copo de liqüidificador estéril - se não tiver liqüidificador próprio para laboratório, transferir os ovos para um balão de 1000 ml contendo pérolas de vidro de tamanho médio, ambos estéreis;
- Homogeneizar os ovos;
- Passar os ovos para o balão que contém a base fria, filtrando em funil e gaze estéril;
- Adicionar o verde de malaquita;
- Homogeneizar bem;
- Deixar repousar durante 30 minutos para as bolhas da superfície estourarem;
- Distribuir 10 a 12 ml por tubo de rosca estéril;
- Colocar os tubos no coagulador inclinados com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°) durante 50 minutos a 85°C - se não tiver coagulador, pode-se coagular os ovos em banho de areia à 85°C colocado em estufa de esterilização, também por 50 minutos, tendo o cuidado de verificar a temperatura constantemente.

Meio não comercial:

- Diluir a L-asparagina em pouca água e dissolver aquecendo lentamente no bico de Bunsen;
- Acrescentar os demais componentes, exceto os ovos e o verde de malaquita;
- Esterilizar em autoclave;
- Seguir os passos 4 ao 14 listados acima.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Esterilização: colocar todos os tubos em estufa;
- Crescimento bom a excelente:

Mycobacterium tuberculosis ATCC 25618
Mycobacterium avium ATCC 25291

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar entre 4 a 8°C por 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Para materiais biológicos de sítios contaminados, fazer descontaminação prévia pelas técnicas desejadas (Petroff, NALC, Lauril sulfato de sódio, Corper & Stoner modificado);
- Semear 5 gotas ou mais, cobrindo bem a superfície do meio;
- Manter os tubos inclinados com a tampa semi aberta até secar bem o inóculo;
- Depois de seco o inóculo, rosquear os tubos e incubar 60 dias à 35°C;
- Semanalmente, abrir as tampas próximo ao bico de Bunsen para ventilar os cultivos e observar a presença ou não de crescimento.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: verde claro
- Positivo: Crescimento de colônias amarelas
- Negativo: ausência de crescimento.

RECOMENDAÇÕES

- Como é um meio rico em proteínas, bactérias proteolíticas contaminam o meio, liqüefazendo-o, para isto, deve-se fazer uma leitura com 24 horas de incubação para tirar as culturas que possam ter contaminado;
- Não usar ovos velhos;
- Não quebrar mais que um ovo por vez, pois pode ter algum estragado e contaminar os demais;
- Manter sempre mais que um béquer estéril para o caso de haver algum ovo estragado;
- Não liberar culturas negativas com tempo inferior a 60 dias de incubação, pois as micobactérias desenvolvem-se lentamente;
- Fazer um esfregaço do crescimento e corar pela técnica de Ziehl para confirmar ser um Bacilo Álcool Ácido Resistente, pois alguns contaminantes podem crescer com pigmento amarelo.

MEIO BIFÁSICO: LÖWENSTEIN E MIDDLEBROOK

PRINCÍPIO

- O meio é constituído de duas fases, uma sólida que é o meio de Löwenstein Jensen e uma líquida, que é o meio 7H-9, juntos fornecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento das micobactérias isoladas de materiais nobres.

UTILIDADE

- Sistema desenvolvido para o isolamento de micobactérias do sangue e de materiais paucibacilares, como líquido, líquido pleural, biópsias, entre outros.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Meio TB para Bacilos de Koch Seg. Löwenstein Jensen ou Löwenstein Medium Base
- Meio comercial: Middlebrook 7H-9 broth
- Meio comercial: Middlebrook Enrichment (suplemento para enriquecimento).
- Ovos de galinha frescos

PROCEDIMENTOS

- Meio de Löwenstein Jensen: procedimento igual ao já descrito, distribuindo 12 ml do meio em frascos estéreis com capacidade para 100 ml (usar tampão de algodão e depois do meio pronto - parte sólida e líquida, substituir por tampa de borracha e lacre de alumínio) e coagulando os frascos bem inclinados.
- **Meio Middlebrook 7H-9 broth:**
 - Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante;
 - Adicionar o glicerol, conforme instruções do fabricante;
 - Esterilizar em autoclave;
 - Resfriar a base à - 50°C;
 - Adicionar o suplemento Middlebrook Enrichment, conforme instruções do fabricante;
 - Homogeneizar bem;
 - Distribuir 15 ml em cada frasco de Löwenstein Jensen inclinado;
 - Fazer o controle de qualidade de esterilidade;
 - Lacrar os frascos com tampa de borracha (previamente submersas em álcool etílico 70% durante 30 minutos) e lacre de alumínio.
 - pH: 6,6 +/- 0,2

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente:
Mycobacterium tuberculosis ATCC 27294 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar os frascos embalados de 4 a 8°C por até 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Por serem materiais estéreis, não é necessário a descontaminação;
- Colher assepticamente 5 ml de sangue e inocular no frasco ;
- Se for outro material, inocular até 5 ml de material;
- Incubar durante 60 dias à 35° +/- 0,2;
- Banhar o meio sólido semanalmente.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: parte sólida: verde clara, parte líquida: âmbar claro.
- Positivo: turvação do meio líquido e crescimento de colônias amarelas no meio sólido.
- Negativo: ausência de turvação e crescimento nos meios líquido e sólido.

RECOMENDAÇÕES

- Não usar frascos com meio líquido turvo;
- Volumes de inóculos inferiores a 2,5 ml podem resultar em culturas falso - negativas;
- Não liberar culturas negativas com tempo inferior a 60 dias de incubação, pois as micobactérias desenvolvem-se lentamente;
- Fazer um esfregaço do crescimento e corar pela técnica de Ziehl para confirmar ser um Bacilo Álcool Ácido Resistente, pois alguns contaminantes podem crescer com pigmento amarelo.

ÁGAR MYCOSEL

PRINCÍPIO

- A Cicloheximida, um dos componentes do meio, serve para selecionar dermatófitos o cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias e alguns fungos filamentosos.

UTILIDADE

- Isolamento de fungos patogênicos, principalmente dermatófitos, a partir de material de investigação contaminado.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Mycosel Ágar, Mycobiotic Ágar ou Ágar seletivo para fungos patogênicos.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir em placas de 90 mm de diâmetro ou 4 ml por tubo;
- Se distribuir em tubos, deixar solidificar com inclinação em forma de bico de flauta (ângulo de 45°).
- pH: 6,9 +/- 0,1

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente: *Trichophyton verrucosum* ATCC 36058, *Candida albicans* ATCC 10231.
- Crescimento inibido: *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida tropicalis*, *Penicillium* spp.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Inocular sempre dois tubos ou placas;
- Se em placa: semear com a técnica de semeadura quantitativa;
- Se em tubo: estriar na superfície inclinada do meio;
- Incubar um dos meios semeados em temperatura ambiente e o outro a 37°C;
- Observar diariamente a presença ou não de crescimento;
- Incubar 40 dias.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo claro opalescente.
- Após o crescimento, deve-se seguir a identificação do microrganismo que cresceu.

RECOMENDAÇÕES

- A ausência de crescimento não indica uma cultura negativa para fungos, pois alguns fungos podem ter o crescimento inibido neste meio.
- Recomenda-se o uso de meios em tubos, pois a incubação demorada resseca com facilidade o meio contido em placas.

ÁGAR SABOURAUD

PRINCÍPIO

- Meio com nutrientes que favorece o crescimento de diversos fungos leve duriformes e filamentosos.

UTILIDADE

- Cultivo e crescimento de espécies de *Candidas* e fungos filamentosos, particularmente associados a infecções superficiais.
- Caracterização macroscópica do fungo filamentoso (colônia gigante).

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Sabouraud Dextrose Ágar.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar à +/- 50°C e distribuir em placas de 90 mm de diâmetro ou 4 ml por tubo;
- Se distribuir em tubos, deixar solidificar com inclinação em forma de bico de flauta (ângulo de 45°).
- pH: 5,6 +/- 0,1

CONTROLE DE QUALIDADE

- Crescimento bom a excelente: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 6 meses.

INOCULAÇÃO

- Inocular sempre dois tubos ou placas;
- Se em placa: semear com a técnica de semeadura quantitativa;
- Se em tubo: semear na superfície inclinada do meio;
- Incubar um dos meios semeados em temperatura ambiente e o outro à 37°C;
- Observar diariamente a presença ou não de crescimento;
- Incubar 40 dias.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo claro opalescente.
- Após o crescimento, deve-se seguir a identificação do microrganismo que cresceu.

RECOMENDAÇÕES

- Recomenda-se o uso de meios em tubos, pois a incubação demorada resseca com facilidade o meio contido em placas.
- Não usar meios vencidos e/ou ressecados.
- Para suspeitas de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, semear em BHI ágar.

4. MEIOS COMERCIAIS PARA PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

BASE DE NITROGÊNIO PARA LEVEDURAS – YEAST NITROGEN BASE

PRINCÍPIO

Determina a capacidade das leveduras de assimilar carboidratos, utilizando um meio a base de nitrogênio livre de carboidratos e discos de papel impregnados com carboidratos, nos quais observa-se o crescimento ao redor, após um período de incubação.

UTILIDADE

Identificar as espécies de leveduras através da prova de assimilação de carboidratos.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Yeast Nitrogen Base ou Base de nitrogênio para leveduras.
- Discos comerciais de carboidratos.
- Discos preparados no laboratório, impregnados com soluções de carboidratos a 1%:
 - Carboidrato 1 g
 - Água destilada 100 ml

PROCEDIMENTOS

Para os discos de carboidratos:

- Se for preparar os discos com carboidratos, preparar 2 dias antes de fazer o meio;
- Usar discos estéreis disponíveis para compra ou esterilizar papel de filtro de 10 mm de diâmetro em autoclave;
- Pesar o carboidrato (cada carboidrato em frasco separado) e adicionar água, homogeneizar bem até completa dissolução - carboidratos utilizados: glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose, melibiose, celobiose, inositol, xilose, rafinose, trealose, dulcitol;
- Esterilizar por filtração (cada um em frasco separado);
- Impregnar os discos previamente estéreis (embeber totalmente os discos);
- Deixar os discos em estufa à 37°C até secarem totalmente .

Para o meio base de nitrogênio:

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante;
- Fundir completamente;
- Distribuir 20 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.

CONTROLE DE QUALIDADE

CARBOIDRATOS	POSITIVO	NEGATIVO
Glicose	<i>Candida albicans</i>	
Maltose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Sacarose	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida krusei</i>
Lactose	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida krusei</i>
Galactose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Melibiose	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>
Celobiose	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>
Inositol	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Candida krusei</i>
Xilose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Rafinose	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>
Trealose	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
Dulcitol	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Meio base: 4 a 10°C por 6 meses.
- Discos: refrigerado e se possível em dessecador durante 1 ano ou mais.

INOCULAÇÃO

- Aquecer o tubo contendo 20 ml de meio base de nitrogênio até fundir totalmente;
- Resfriar a base à 47 - 48°C;
- Fazer uma suspensão das leveduras na escala 4 ou 5 de McFarland em 4 ml de água destilada estéril, usando um cultivo de leveduras de 24 a 72 horas;
- Despejar a suspensão de leveduras no tubo contendo a base de nitrogênio;
- Homogeneizar bem;
- Despejar o conteúdo homogeneizado (meio base + suspensão de leveduras) em placa de Petri de estéril de 150 mm de diâmetro;
- Esperar solidificar em temperatura ambiente;
- Colocar os discos impregnados com carboidratos com auxílio de uma pinça flambada;
- Incubar à 30°C durante 18 a 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo palha.
- Positivo: halo de crescimento ligeiramente opaco ao redor dos discos, que significa a assimilação do açúcar pela levedura.
- Negativo: Ausência de halo de crescimento. O meio permanece inalterado.

RECOMENDAÇÕES

- Não usar cultivos de leveduras superiores a 72 horas;
- Não usar inóculo inferior ao recomendado, pois pode resultar em prova falso - negativa;
- Não adicionar a suspensão de leveduras à base com temperatura superior a 48°C, pois pode inativar as células e resultar em prova falso - negativa;
- Após homogeneizar o meio base e suspensão de leveduras, despejar imediatamente na placa de Petri, pois solidifica rapidamente.

ÁGAR CITRATO SIMMONS

PRINCÍPIO

- Verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia, alcalinizando o meio.

UTILIDADE

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Citrato Simmons.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio segundo instruções do fabricante;
- Ajustar o pH para 6,9 ±0,2;
- Aquecer sob agitação até fundir o ágar;
- Distribuir em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes, para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

INOCULAÇÃO

- Com o auxílio de um fio bacteriológico, inocular na superfície a colônia, não furar a base;
- Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: verde
- Positivo: cor azul ou crescimento no local do inóculo.
- Negativo: não há crescimento e a cor permanece inalterada.
- Se houver crescimento visual na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para alcalino (azul).

Leitura inicial com 24 horas:

- Se resultado positivo: encerrar o teste.
- Se resultado negativo ou houver dúvida: reincubar por mais 24/48 horas.

Leitura com 48 horas:

- Se houver crescimento visível na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, (encerrar o teste).
- Se resultado negativo ou houver dúvida, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para alcalino(azul).

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C de 6 a 8 semanas;
- Após este período realizar controles negativo e positivo semanalmente.

RECOMENDAÇÕES

- Manter a tampa do tubo frouxa, o meio necessita de oxigênio.
- Não se devem transportar colônias de meios que contenham glicose ou outros nutrientes/substratos, pois podem entrar em contato com o meio de citrato, podendo dar um resultado falso positivo.
- Se algum resultado estiver duvidoso, inocular um novo tubo e incubar em temperatura ambiente (22 a 25°C) por até 7 dias.
- Não usar repiques de caldo.
- Deixar o tubo em temperatura ambiente antes de inocular a bactéria.
- Para fazer o inóculo flambar o fio bacteriológico.
- Não fazer inóculo muito denso (pode acidificar o meio deixando-o amarelo).

ÁGAR BÍLIS-ESCULINA

PRINCÍPIO

- A prova de Bile-Esculina é baseada na capacidade de algumas bactérias hidrolisarem esculina em presença de bílis. A esculina é um derivado glicosídico da cumarina. As duas moléculas do composto (glicose e 7-hidroxycumarina) estão unidas por uma ligação éster através do oxigênio. A esculina é incorporada em um meio contendo 4% de sais biliares.
- As bactérias Bile-Esculina POSITIVAS, são capazes de crescer em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina no meio resulta na formação de glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos (fornecidos pelo composto inorgânico do meio - o citrato férrico), formando um complexo negro.

UTILIDADE

- Separação dos *Streptococcus* Bile-Esculina positiva dos Bile-Esculina negativa.
- Identificação dos *Enterococcus* spp., que são Bile-Esculina positiva.
- Identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores e enterobactérias, usar o meio sem bÍlis (vide prova de esculina).

FÓRMULA/ PRODUTO

- Meio comercial: Ágar BÍlis-Esculina

Fórmula:	Peptona	5 g
	Extrato de carne	3 g
	BÍlis	40 g
	Esculina	1 g
	Citrato férrico	0,5 g
	Ágar	15 g
	Água destilada	1000 ml
	pH = 7,0	

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Fundir o meio;
- Distribuir 2,5 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave;
- Após retirar da autoclave, inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de "bico de flauta" (ângulo de 45°).

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C por 4 meses.

INOCULAÇÃO

- Estriar a superfície inclinada do meio;
- Incubar a 35°C 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

Cor original do meio: acinzentado

- Positivo: Enegrecimento em pelo menos metade ou mais do meio.
- Negativo: Ausência de enegrecimento ou crescimento de menos da metade do meio após 72 horas de incubação.

RECOMENDAÇÕES

- Provas negativas com 24 horas de incubação, recomenda-se período de incubação maior (48 horas).
- Alguns *Streptococcus* do grupo *viridans* (cerca de 3%) podem hidrolizar a esculina em presença de bÍlis se incubados em atmosfera de CO₂.

ÁGAR SANGUE - CAMP

PRINCÍPIO

- Consiste na interação da beta hemólise secretada pelo *Staphylococcus aureus* com o microrganismo em estudo, que secreta uma proteína, denominada "fator CAMP", produzindo aumento de hemólise no local da inoculação.

UTILIDADE

- Separação do *Streptococcus* beta hemolítico presumível do grupo B de Lancefield (*S. agalactiae*) e da *Listeria monocytogenes* (CAMP positivos) dos demais *Streptococcus* beta hemolíticos e espécies de *Listeria*.

FÓRMULA/ PRODUTO

Para esta prova utiliza-se:

- Placa de meio Ágar Sangue.
- Cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de beta hemolisina ATCC 25923.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813.
- Negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

INOCULAÇÃO

- Com auxílio do fio bacteriológico, semear na superfície de meio Ágar Sangue a cepa de *Staphylococcus aureus* com uma única linha reta;
- Novamente com o fio bacteriológico (flambado), tocar nas colônias em estudo;
- Semear uma única linha reta na superfície do meio Ágar Sangue, perpendicularmente à linha de semeadura do *S. aureus*, sem tocar no inóculo do *S. aureus*;
- Logo em seguida, sem flambar o fio, picar o meio Ágar Sangue duas vezes, uma de cada lado da semeadura da cepa em estudo, sem tocar nas duas linhas de inóculo já feitos (a do *S. aureus* e da cepa em estudo);
- Incubar à 35°C 24 horas.

(a) Inóculo do *S. aureus*

(b) Inóculo da cepa em estudo

INTERPRETAÇÃO

- Positivo: Aumento da área de hemólise em forma de flecha no local onde estão mais próximas as duas estrias de crescimento.
- Negativo: Ausência de aumento da hemólise. Observa-se nitidamente a hemólise do *S. aureus* e da cepa em estudo, inalteradas.

RECOMENDAÇÃO

- Não utilizar cepas velhas de *S. aureus*, pois podem não produzir beta hemolisina.
- Não tocar as estrias da semeadura das cepas, para não dar um resultado falso – negativo.
- Não utilizar placas de Ágar Sangue velhas que dificultem a leitura da prova, já que é baseada na hemólise das cepas.

CALDO BASE DE MOELLER

PRINCÍPIO

- As descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para formarem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação, origina dióxido de carbono como produto secundário.
- Emprega-se normalmente três aminoácidos para identificação dos microrganismos: lisina, ornitina e arginina. A base de Moeller é a mais utilizada. Os produtos aminados específicos, são:

- Lisina: Cadaverina;
- Ornitina: Putrescina;
- Arginina: Citrulina.

A conversão da arginina em citrulina é uma atividade de diidrolase, e não descarboxilase, na qual o grupo NH_2 é retirado da arginina como primeira etapa. Em seguida, a citrulina é convertida em ornitina, que sofre descarboxilação para formar putrescina.

- A incubação deve ser em anaerobiose e para isso, é adicionado 1 ml de óleo mineral estéril após a inoculação. No início da incubação, a glicose contida no meio é fermentada e ocorre viragem de cor púrpura para o amarelo. Quando o aminoácido é descarboxilado, as aminas alcalinas formadas revertem a cor do meio para púrpura original.

UTILIDADE

- Verificar a capacidade de microrganismos usarem enzimas, auxiliando na identificação.
- Utilizado principalmente para identificações de enterobactérias, bacilos Gram negativos não fermentadores, estafilococos.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio base comercial: Caldo Base de Moeller para Descarboxilase.
- Aminoácidos: L lisina ou DL lisina, L ornitina ou DL ornitina, L arginina ou DL arginina.

PROCEDIMENTOS

- Preparar os meios com a Base de Moeller e aminoácidos;
- Preparar o meio apenas com a Base de Moeller, sem aminoácidos, que será usada como controle;
- Seguir as recomendações do fabricante para pesar o meio Base de Moeller;
- Se usar aminoácido **L** (*levógiro*), adicionar **1 grama** do aminoácido para cada 100 ml de meio base;
- Se usar aminoácido **DL** (*dextrógiro*), adicionar **2 gramas** do aminoácido para cada 100 ml de meio base;
- Homogeneizar bem o meio;
- Acertar o pH para 6,0 com HCl 1 N ;
- Distribuir 2 ml por tubo (usar tubos de rosca);
- Esterilizar em autoclave.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo:
 - Lisina: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ou *Enterobacter aerogenes* ATCC 13047.
 - Ornitina: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ou *Serratia marcescens* ATCC 13880.
 - Arginina: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ou *Enterobacter sakazakii*.
- Negativo:
 - Lisina: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ou *Citrobacter freundii* ATCC 8454.
 - Ornitina: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ou *Citrobacter freundii* ATCC 8454.
 - Arginina: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13047 ou *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar entre 4 a 10 °C por 3 meses.

INOCULAÇÃO

- A partir de crescimento recente, inocular a colônia em estudo no tubo contendo o aminoácido e no tubo controle;
- Colocar aproximadamente 1 ml de óleo mineral estéril em cada tubo;
- Incubar à 35 +/- 1°C em aerobiose.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: púrpura
- Positivo:
 - Tubo controle (sem aminoácido) : amarelo e turvo - indica que o microrganismo é viável e o pH do meio abaixou o suficiente para ativar as enzimas descarboxilase.
 - Tubo com aminoácido: púrpura e turvo- indica a formação de aminas a partir da reação de descarboxilação.
- Negativo:
 - Tubos controle e com aminoácido: púrpura.

RECOMENDAÇÕES

- Verificar se o inóculo foi satisfatório para o crescimento, pois a cor original do meio - púrpura, sem apresentar turvação não significa positividade e sim, ausência de crescimento bacteriano.
- Como a reação ocorre em anaerobiose, é imprescindível a adição de óleo mineral.
- Pode-se autoclavar o meio já com o óleo mineral ou adicionar após a inoculação do microrganismo.
- Para alguns microrganismos, como bacilos Gram negativos não fermentadores, é necessário um período de incubação prolongado (24 a 72 horas).

ÁGAR DNASE

PRINCÍPIO

- Cepas de alguns microrganismos produzem DNase e endonuclease termoestável. Estas enzimas hidrolisam ácido desoxirribonucléico (DNA) contido no meio de cultura após um período de incubação. Posteriormente este meio é acidificado com HCl 1N para a revelação da prova.

UTILIDADE

Prova de identificação que separa os principais microrganismos de importância clínica, entre eles:

- DNase positivos: *Staphylococcus aureus* , *Serratia* spp. e *Proteus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Moraxella catarrhalis*.
- DNase negativos: *Staphylococcus* coagulase negativa, demais enterobactérias, demais bacilos Gram negativos não fermentadores.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: DNase Ágar.

PROCEDIMENTOS

Pode-se revelar a prova de duas maneiras:

- Com uma solução de ácido clorídrico 1 N
- Adicionando à base do meio de cultura azul de Toluidina O.
- **Para a revelação com ácido clorídrico 1N:**
 - Preparar e esterilizar o meio conforme instruções do fabricante;
 - Esfriar o meio à aproximadamente 50°C;
 - Distribuir em placas de petri de 50 mm de diâmetro.

Preparar uma solução de HCl 1N, seguindo a fórmula abaixo:

$$N = \frac{C1}{V} \quad \left(\frac{\text{número de equivalentes grama de soluto}}{\text{volume da solução}} \right)$$

$$C1 = \frac{M1}{E} \quad \begin{array}{l} \text{(peso molecular do soluto)} \\ \text{(volume da solução)} \end{array}$$

$$E = \frac{M}{x} \rightarrow x: \quad \begin{array}{l} \text{para bases: OH despreendido na reação} \\ \text{para ácidos: H}^+ \text{ ionizáveis} \\ \text{para oxidantes / redutores: variação do NOX} \\ \text{para sais normais: valência do cátion ou ânion} \end{array}$$

▪ **Para a revelação com azul de Toluidina O:**

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acrescentar para cada 1000 ml de base 0,1g de azul de Toluidina O;
- Esterilizar em autoclave;
- Esfriar o meio à aproximadamente 50°C;
- Distribuir em placas de petri de 50 mm de diâmetro.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ou *Serratia marcescens* ATCC 13880.
- Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ou *Escherichia coli* ATCC 25922.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Meio: 4 a 10 °C por 3 meses.
- Ácido Clorídrico 1N:
 - Guardar em frasco âmbar, em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, calor e umidade.
 - Validade: 6 meses.

INOCULAÇÃO

Para as duas técnicas de preparação, a inoculação é a mesma:

- Com auxílio de um fio bacteriológico, tocar nas colônias em estudo e fazer um esfregaço circular e denso na placa de DNase ;
- Incubar à 35 +/- 1°C 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

Revelação com HCl 1 N:

- Cor original do meio: amarelo claro
- Colocar sobre o crescimento bacteriano HCl 1 N até banhar totalmente a superfície do meio;
- Aguardar aproximadamente 3 minutos ou até que o meio fique opaco.
- Positivo: Presença nítida de halo claro na parte inferior e em volta da colônia.
- Negativo: Ausência de halo claro em volta da colônia.

revelação com azul de toluidina o:

- Cor original do meio: azul claro
- Positivo: Presença de coloração rosa na parte inferior e em volta da colônia.
- Negativo: Ausência de cor rosa. O meio permanece com a cor original, azul.

RECOMENDAÇÕES

- Usar sempre uma cepa controle positivo para facilitar a leitura da prova;
- Em uma mesma placa, pode-se fazer até 4 testes (placas de 50 mm de diâmetro);
- armazenamento incorreto e uso com validade vencida do HCl 1 N pode dar leituras falso negativas;
- Para a detecção da atividade de DNase não é necessário que haja crescimento, por isso é que a semeadura deve ser de forma circular densa e não de estria;

- Para o meio preparado com Azul de Toluidina O, algumas cepas requerem um período maior de incubação (até 48 horas) para produzirem DNase;
- Usar cultura jovem (até 24 horas).

ÁGAR ESCULINA

PRINCÍPIO

- Verifica se a bactéria é capaz de hidrolisar a esculina.
- A esculina exige sais de ferro formando precipitado marrom escuro ou preto.

UTILIDADE

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores;
- Para identificação de *Streptococcus* e *Enterococcus*, usar o meio com bÍlis, vide prova de Bile-Esculina.

FÓRMULA / PRODUTO

- | | |
|--|--------|
| ▪ Ágar tríptico de soja (TSA) ou base de ágar sangue | 4 g |
| ▪ Citrato férrico | 0,05 g |
| ▪ Esculina | 0,1 g |
| ▪ Água destilada | 100 ml |

PROCEDIMENTOS

- Pesar o TSA ou a base de ágar sangue, o citrato férrico e a esculina e colocar tudo no mesmo Erlenmeyer;
- Colocar água destilada;
- Ajustar o pH para 7,0;
- Aquecer lentamente até fundir o ágar e dissolver o citrato férrico (lentamente porque o citrato férrico demora a dissolver);
- Distribuir 3 ml do meio em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Negativo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

INOCULAÇÃO

- Inocular colônias de crescimento recente (18 – 24 hs);
- Picar o meio e semear na superfície do ágar;
- Incubar a 35 °C por 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: palha.
- Positivo: marrom escuro ou preto.
- Negativo: inalterado (palha).

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 8°C, de 6 a 8 semanas.
- Após este período realizar controle negativo e positivo semanalmente.

RECOMENDAÇÕES

- A enzima glicosidase é responsável pela hidrólise da esculina em todas as enterobactérias exceto a *Escherichia coli*. A *Escherichia coli* não possui a enzima glicosidase sendo necessário usar a lactose, outro dissacarídeo ou outra fonte de carbono. Fazer um inóculo leve com agulha bacteriológica e interpretar após 18-24 horas.
- A produção de piocina pela *Pseudomonas aeruginosa* pode escurecer o meio, isso não é uma reação positiva.
- Resultado falso positivo pode ocorrer pela produção de H²S em não fermentadores, semelhante ao bacilo da bactéria *Shewanella putrefaciens*.

ÁGAR FENILALANINA

PRINCÍPIO

- Verifica a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação enzimática.

UTILIDADE

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Ágar Fenilalanina

Solução de cloreto férrico:

Cloreto férrico 10 g
 Adicionar 100 ml de água destilada
 Colocar em frasco âmbar.

Validade: 6 meses

A solução de cloreto férrico 10% é utilizada para revelar a atividade da enzima fenilalanina desaminase no meio de fenilalanina.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob constante agitação até fundir o meio;
- Ajustar o pH para 7,3 ±0,2;
- Distribuir em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 8427 ou *Proteus mirabilis* ATCC 12453.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

INOCULAÇÃO

- Fazer um inóculo denso;
- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas;
- Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

Adicionar diretamente o cloreto férrico no tubo inoculado, antes da interpretação do resultado e distribuir o reagente sobre a superfície do meio.

- Cor original do meio: amarelo palha.

- Positivo: formação de uma coloração esverdeada na superfície do meio após a adição do cloreto férrico.
- Negativo: o meio permanece inalterado.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 8°C, de seis a oito semanas.

RECOMENDAÇÕES

- Um resultado positivo deve ser interpretado imediatamente após a adição do reagente, pois a cor verde desbota rapidamente. A interpretação deve ser feita em até 5 minutos.

CTA – CYSTINE TRYPTICASE AGAR

PRINCÍPIO

- CTA é um meio semi-sólido, recomendado para o estudo de fermentação de carboidratos de microrganismos exigentes.

UTILIDADE

- Usado para diferenciar espécies de *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Corynebacterium* spp.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial Cystine Trypticase agar Medium.
- Carboidratos mais utilizados: glicose, maltose, lactose, sacarose, frutose, manose.

Carboidrato 10 g
 Água destilada 100 ml

pH: 7,3 +/- 0,2

PROCEDIMENTOS

- Esterilizar os carboidratos, separadamente, por filtração e reservar;
- Pesas o CTA conforme instruções do fabricante, acrescentar 900 ml de água e homogeneizar bem;
- Esterilizar em autoclave;
- Esfriar a base a aproximadamente 50°C;
- Adicionar o carboidrato esterilizado por filtração;
- Distribuir em 3 ml por tubo;
- Deixar os tubos esfriar na posição vertical.

CONTROLE DE QUALIDADE

	POSITIVO	NEGATIVO
Glicose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Maltose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Lactose	<i>Neisseria lactamica</i>	<i>Neisseria sicca</i>
Sacarose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Frutose	<i>Neisseria sicca</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Manose	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Temperatura ambiente por 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Fazer um inóculo bem denso, no centro do meio;
- Incubar à 35°C em jarra com vela acesa e gaze embebida em água de torneira para manter a umidade da atmosfera.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: alaranjado
- Positivo: cor amarela, indicando acidificação (fermentação) do meio e turvação.
- Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, alaranjado, e sem turvação.

RECOMENDAÇÕES

- Para provas negativas, incubar um período maior (72 horas);
- Não autoclavar a base com o carboidrato, pois a alta temperatura pode degradar o carboidrato;
- Fazer inóculo denso, pois inóculos fracos podem dar resultado falso negativo.

CALDO TRIPTONA E SIM

PRINCÍPIO

- Determinam a habilidade do microrganismo de metabolizar o triptofano em indol. Triptofano é um aminoácido que pode ser oxidado por certas bactérias resultando na produção de indol, após a adição de reagentes de Erlich ou Kovacs.

UTILIDADE

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, *Haemophilus* e anaeróbios.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Caldo Triptona.
- Meio comercial: SIM (sulfato/indol/motilidade ágar).

Reativo Erlich

Paradimetilaminobenzaldeído	1 g
Álcool etílico (95%)	95 ml
Ácido clorídrico concentrado	20 ml

- Guardar em frasco âmbar em temperatura ambiente (22-25°C).
- Cor original do reativo de Erlich: amarelo

Ou

Reativo de Kovacs (pode ser adquirido comercialmente pronto para uso) ou ser preparado no laboratório:

Álcool isoamílico	150 ml
Paradimetilaminobenzaldeído	10,0 g
Ácido clorídrico concentrado	50 ml

- Dissolver o aldeído em álcool e adicionar lentamente o ácido clorídrico;
- Guardar em frasco âmbar e no refrigerador quando não estiver em uso.

Obs: Não conservar em temperatura ambiente por longo período a cor pode ser alterada de amarelo palha para marrom, perdendo assim a sensibilidade.

Xilol : pode ser adquirido comercialmente pronto para uso.

PROCEDIMENTOS

Meio Caldo Triptona

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 3,0 ml em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente na posição vertical.

Meio SIM

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 3,0 ml em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

CONTROLE DE QUALIDADE

Controle qualidade para meio Caldo Triptona:

- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Negativo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Controle qualidade para meio SIM:

Microrganismo	H ₂ S	INDOL	MOTILIDADE
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	neg	neg	neg
<i>Escherichia coli</i>	neg	+	+

Proteus vulgaris ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Escherichia coli* ATCC 25922

INOCULAÇÃO

Meio Caldo Triptona

- Fazer um inóculo leve com colônia pura de cultura de 18-24 horas (para enterobactérias, bacilos Gram negativos não fermentadores ou anaeróbios);
- Fazer um inóculo denso com colônia pura de cultura de 18-24 horas (para *Haemophilus*);
- Incubar a 35°C por 24 horas (enterobactérias) ou até 48 horas (bacilos Gram negativos não fermentadores ou anaeróbios) em aerobiose ou anaerobiose, respectivamente.

Meio SIM

- Com o auxílio da agulha, inocular uma colônia no meio na posição vertical, lentamente até a base;
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial do inóculo;
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio:
- Após incubação, revelar com reagente de Ehrlich ou Kovacs.
- A escolha entre os reagentes de Ehrlich ou Kovacs depende da preferência dos Gram negativos não fermentadores ou anaeróbios, que podem produzir mínima quantidade de indol.

Revelação com reativo de Ehrlich ou Kovacs no meio de Caldo Triptona

- Colocar 1mL de xilol no tubo com crescimento bacteriano, **homogeneizar vigorosamente** e aguardar 1 minuto;
- Adicionar pela parede do tubo 0,5 ml do reativo de Erlich e realizar a leitura.

Indol positivo: aparecerá um anel vermelho logo abaixo da camada de xilol.
Indol negativo: permanecerá um anel amarelo logo abaixo da camada de xilol.

Revelação com reativo de Kovacs no meio SIM

- **Realizar a leitura da motilidade e do H₂S.**
- Em seguida adicionar 5 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo no meio contendo o crescimento bacteriano.
- **Agitar o tubo suavemente** e proceder a leitura do indol.

- Motilidade positiva: microrganismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez.
- Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido.
- H₂S positivo: ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra.
- H₂S negativo: linha ao longo da inoculação inalterada.

- Indol positivo aparecerá um anel vermelho.
- Indol for negativo aparecerá um anel amarelo.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Caldo Triptona: 6 meses se conservado de 2 a 8°C.
- Meio SIM: 6 meses se conservado de 2 a 8°C em tubos com tampas de rosca, tubos com tampão de algodão o meio pode ressecar antes deste prazo.

RECOMENDAÇÕES

- Um ótimo pH para triptofanase é levemente alcalino (pH 7,4-7,8), um pH ácido pode baixar a produção do indol indicando um resultado falso negativo ou positivo fraco.
- Cultura para ser testada produção de indol deve ser incubada em aerobiose, a baixa tensão de oxigênio baixa a produção de indol.
- Indol positivo se perde após 96 horas de incubação.
- Alguns microrganismos formam indol, mas se quebram ou baixam rapidamente a produção, podendo ocorrer um resultado falso negativo. Ocorre principalmente entre algumas espécies de *Clostridium* spp.
- Pequenas modificações podem ser necessárias para testar a produção de indol em não fermentadores (fracos produtores de indol), como a utilização de um meio enriquecido, como o meio BHI enriquecido com 2% de soro de coelho ou isovitalex, extração com xilol e revelação com reagente de Ehrlich.
- Na extração de indol com o reagente xilol, colocar pequena quantidade de xilol para evitar a diluição do indol tornando-o fraco positivo ou negativo.
- Algumas cepas de *Cardiobacterium hominis*, *Kingella* spp., *Sutonella indologenes*, *Eikenella corrodens*, necessitam de inóculo denso no caldo de triptona, incubação de 48 horas, extração com xilol e revelação com reagente de Ehrlich.

CALDO MALONATO

PRINCÍPIO

- Determina a habilidade do microrganismo de utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinização do meio.

UTILIDADE

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Caldo Malonato.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Ajustar o pH $6,7 \pm 0,2$;
- Distribuir 1,5 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

INOCULAÇÃO

- Inocular colônias puras de 18 a 24 horas;
- Inóculo leve;
- Incubar a 35°C de 24-48 horas, observando o cultivo diariamente.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: verde.
- Positivo: azul.
- Negativo: inalterado (verde).

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 10°C de 6 a 8 semanas.
- Após este período realizar controle positivo e negativo semanalmente.

RECOMENDAÇÕES

- Alguns resultados negativos produzem cor amarela, isso porque a fermentação da glicose aumenta a acidez.
- Alguns microrganismos malonato positivo produzem uma fraca alcalinização, dificultando a interpretação. Se o resultado for duvidoso incubar um tubo sem inóculo para comparação, junto com o teste em questão, se não aparecer nenhum traço azul, incubar por mais 24 horas, liberando o resultado negativo após incubação de 48 horas.
- Cuidado ao interpretar resultados após incubação prolongada. Cor azul fraco (azul esverdeado) pode parecer uma reação fraca positivo podendo ser ignorado.

CALDO NITRATO

PRINCÍPIO

- Determina a habilidade do microrganismo de reduzir o nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) ou gás nitrogênio (N_2) (denitrificação).

UTILIDADE

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias, não fermentadores, anaeróbios, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Mycobacterium*.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Caldo Nitrato.
- Reagentes para revelação da reação.

Solução A

Ácido sulfanílico 0,8 g
Ácido acético 5N 100 ml

Solução B

N,N-dimetil-l-naftilamina 0,6 g
Ácido acético 5N* 100 ml

* Ácido acético 5N
Ácido acético glacial 40 ml
Água destilada 100 ml

Zinco em pó (pronto para uso)

PROCEDIMENTOS

Caldo nitrato

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acertar o pH 7,0;
- Distribuir 3 ml do meio em cada tubo, contendo um tubo de Durhan invertido;
- Esterilizar em autoclave;
- Deixar o tubo esfriar na posição vertical

Reagentes para revelação da reação.

- **Solução A**
 - Dissolver o ácido sulfanílico em uma parte do ácido e depois completar com o restante do ácido acético q.s.p. 100 ml.
- **Solução B**
 - Dissolver o N,N-dimetil-l-naftilamina com uma parte do ácido e completar o restante do ácido acético q.s.p. 100 ml.

CONTROLE DE QUALIDADE

Resultado	Cepa	Resultado esperado
Nitrato reduzido a nitrito	Enterobactérias	Coloração vermelha
Nitrato a gás	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bolhas no tubo de Durhan
Nitrato não reduzido	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Coloração vermelha somente após adição de pó de zinco

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC

INOCULAÇÃO

- Fazer um inóculo denso, com colônias recentes (18 – 24 horas) no meio com alça bacteriológica;
- Não agitar o tubo após inoculação;
- Incubar 35±1°C por 24 a 48 horas, sendo necessário algumas vezes até 5 dias;
- Verificar se existe crescimento aparente no meio antes de colocar os reagentes para revelar a reação;
- Verificar a presença de bolhas dentro do tubo de Durhan.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: incolor a palha.
- Verificar se há bolhas de gás dentro do tubo de Durhan, se houver significa que a bactéria reduziu nitrato a gás = denitrificação.
- Adicionar 5 gotas dos reagentes A e B no meio, sem homogeneizar. Se houver desenvolvimento de cor vermelho tijolo significa que a bactéria reduziu nitrato a nitrito.
- Se após a adição dos reagentes A e B o tubo continuar incolor, adicionar uma pitada de pó de zinco no tubo, se houver desenvolvimento de cor vermelho tijolo significa que a bactéria não reduziu nitrato a nitrito e o nitrato ainda permanece no meio.

- **IMPORTANTE:** algumas bactérias não conseguem reduzir nitrato a nitrito e só conseguem reduzir nitrito, como por exemplo *alcaligenes faecalis* e *oligella uretralis*, havendo a necessidade de utilizar o caldo nitrito para este fim.

RESULTADO	REAGENTES A e B	PÓ DE ZINCO	GÁS NO TUBO DE DURHAN
reduziu nitrato a nitrito	+	não houve reação	não houve reação
não reduziu nitrato a nitrito	neg	pos	neg
nitrato reduzido a gás	neg	neg	+

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Caldo nitrato: conservar o meio de 4 a 8°C por até 6 meses.
- Soluções A e B: guardar em frasco escuro na geladeira (4 a 8°C) por até 12 meses.
- Ácido acético 5N: Conservar de 4 a 8°C por até 12 meses.

RECOMENDAÇÕES

- Utilizar o tubo de nitrato sem inocular como controle negativo, para evitar resultado falso positivo, devido à alta sensibilidade do teste.
- Quando for adicionado o pó de zinco, não colocar em excesso, pode resultar em falso negativo (incolor).

MEIO BASE PARA OXIDAÇÃO E FERMENTAÇÃO - OF

PRINCÍPIO

- Verificar a capacidade do microrganismo em utilizar os carboidratos pela via oxidativa ou fermentativa.

UTILIDADE

- Diferenciar bacilos Gram negativos quanto ao tipo de metabolismo empregado em utilizar carboidratos.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Meio base de OF
- Carboidratos (dextrose ou glicose, lactose, sacarose, xilose, maltose, manitol etc).
- Vaselina líquida estéril.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer o meio até dissolver todo o ágar;
- Separar volumes iguais em diferentes Beckers, dependendo do número de carboidratos que serão preparados;
- Adicionar 1g do carboidrato para cada 100 ml de meio base e homogeneizar;
- Distribuir 2 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em vapor fluente por 20 minutos (deixar a válvula de pressão da autoclave aberta e, quando estiver saindo bastante vapor, começar marcar o tempo. Vapor fluente só pode ser feito

em autoclave com tampas reguláveis para saída de vapor. Autoclaves horizontais não possuem controle de saída de vapor, são automáticas);

- Pode-se também esterilizar a base e adicionar os açúcares esterilizados por filtração em filtros Millipore 0,45 µm (90 ml de base autoclavada e 10 ml de açúcar (esterilizado por filtração));
- Deixar esfriar a temperatura ambiente na posição vertical.

CONTROLE DE QUALIDADE

	Resultado	Cepa	Resultado esperado
OF-GLICOSE	Oxidador	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F- amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F- inalterado
OF-FRUTOSE	Oxidador	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F- amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F-inalterado
OF-LACTOSE	Oxidador	<i>Burkholderia cepacia</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F-amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F- inalterado
OF-MALTOSE	Oxidador	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F-amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F- inalterado
OF-MANITOL	Oxidador	<i>Burkholderia cepacia</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F-amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F- inalterado
OF-SACAROSE	Oxidador	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F- amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F-inalterado
OF-XILOSE	Oxidador	<i>Burkholderia cepacia</i>	A-amarelo, F-inalterado
	Fermentador	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/F-amarelo
	Inalterado	<i>Alcaligenes faecalis</i> *	A/F- inalterado

A= tubo aberto; F= tubo fechado com vaselina líquida

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

* *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 ou *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238

INOCULAÇÃO

- Inocular densamente até o fundo do tubo com a agulha bacteriológica, colônias provenientes de uma placa de crescimento de 18 a 24 hs.;
- Inocular dois tubos, em um dos tubos acrescentar 1,0 ml de vaselina líquida estéril, no outro tubo não colocar vaselina;
- Incubar á temperatura de 35°C por 48 horas ou mais;
- Se resultado negativo, pode ser necessário até 4 dias, excepcionalmente 14 dias, observando diariamente.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: verde
- Oxidador: tubo aberto - desenvolvimento de cor amarela
tubo fechado - inalterado (verde)
- Fermentador: tubo aberto e fechado - desenvolvimento de cor amarela
- Assacarolítico: tubo aberto e fechado - inalterado (verde)

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 8°C por até 6 meses.

RECOMENDAÇÕES

- Sempre antes de interpretar a reação verificar se há crescimento nos tubos, porque algumas bactérias não crescem no meio OF, sendo necessário enriquecimento do meio, acrescentando 2 % de soro de coelho ou cavalo.
- Importante deixar tampa frouxa no tubo aberto.

ÁGAR TSI – TRIPLO AÇÚCAR FERRO

PRINCÍPIO

- Este meio contém três açúcares: 0,1% glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose, vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo).
- A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo. O ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada.
- Essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada ou bico, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada profundidade ou fundo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia.
- Quando se prepara o meio, é importante que o bico e a profundidade tenham o comprimento igual ao redor de 3 cm cada um, de modo que o efeito das duas câmaras seja conservado.

UTILIDADE

- Diferenciar bacilos Gram negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: TSI (tríplice açúcar ferro).

PROCEDIMENTOS

- Pesar o TSI conforme instruções do fabricante;
- Ajustar o pH para $7,3 \pm 0,2$;
- Distribuir em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°).
- Deixar solidificar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

Microrganismo	ATCC	Superfície	Base	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	25922	Ácido	Ácido, gás	neg
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Alcalino	Ácido	neg
<i>Edwardsiella tarda</i>	15947	Alcalino	Ácido	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Alcalino	Alcalino	+

INOCULAÇÃO

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas;
- Semear por picada até o fundo e na superfície do meio;
- Incubar 24 hs a 35°C , com a tampa semi aberta.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: vermelho laranja, levemente opalescente.
- Leitura: entre 18 e 24hs.
- Cor púrpura = alcalino.
- Cor amarelo = ácido.

Reações ápice/base:

- Púrpura/amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos).
- Amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares).

- Presença de gás (CO₂) = bolhas ou meio fragmentado.
- H₂S positivo = presença de precipitado negro.

ÁPICE	BASE	H ₂ S	GÁS	INTERPRETAÇÃO MAIS PROVÁVEL
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Sem crescimento = bactéria exigente
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Não fermentador ou Gram (+)
Amarelo	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Gram (+) ou esquecimento de picar a base
Amarelo	Amarelo	neg	varia	Enterobactérias ou <i>Aeromonas</i> Lac (neg)
Amarelo	Amarelo	+	varia	<i>Samonella</i> , <i>Proteus/Morganella/Providencia</i> e <i>Citrobacter</i>

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar por até 6 meses de 2 a 8°C.

RECOMENDAÇÕES

- Quando há produção de H₂S significa que a base é sempre ácida.
- Não realizar leitura com menos de 18 ou mais de 24 horas, podendo resultar em falsas reações.
- Não utilizar alças bacteriológicas para não fragmentar o meio, ocasionando falsa reação de gás, utilizar fio bacteriológico.
- Qualquer traço de escurecimento no meio deve ser indicado com H₂S positivo.

ÁGAR BASE URÉIA (CHRISTENSEN)

PRINCÍPIO

- Determinar a habilidade do microrganismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio.

UTILIDADE

- Bacilos Gram negativos fermentadores e não fermentadores, *Staphylococcus* e *Haemophilus*.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Uréia.
- Solução de uréia a 40% (40 g uréia + 100 ml de água destilada).

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio de uréia conforme instruções do fabricante;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 50°C e adicionar asepticamente 5 ml da solução de uréia a 40% em 95 ml do meio base;
- Homogeneizar e distribuir 3 ml do meio asepticamente em tubos estéreis com tampa de rosca;
- Inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.
- Obs: A solução de uréia a 40% é uma solução hipertônica e o risco de contaminação é baixo, porém, pode-se esterilizar a solução por filtração (filtro Millipore de 0,45 µm).

CONTROLE DE QUALIDADE

Esterilidade: colocar 100% do lote preparado na estufa 35 ±1°C por 24 horas. Se não houver mudança de cor liberar para uso.

- Positivo: *Proteus vulgaris* ATCC 13315
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922

INOCULAÇÃO

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas;
- Fazer um inóculo denso;
- Semear na superfície do meio, não picar a base, pois a base pode servir como controle;
- Incubar 35°C de 6 a 24 horas, podendo ser necessário até 6 dias.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo palha.
- Positivo: alteração do meio para cor de rosa, pink.
- Negativo: sem alteração de cor do meio.

Diferentes graus de hidrólise da uréia podem ocorrer:

- Tubo inteiro cor pink.
- Superfície do tubo cor pink, base não muda de cor.
- Fracamente positivo: ápice cor pink, restante do tubo não muda de cor.
- Positivo rápido: 1 – 6 horas para *Proteus* spp.
- Positivo tardio: 24 horas a 6 dias ou mais tempo de incubação. Ex: algumas cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Haemophilus*.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 8°C por até 6 meses.
- Após este período realizar controle negativo e positivo semanalmente.

RECOMENDAÇÕES

- Não aquecer a solução base da uréia, pois a uréia pode se decompor se aquecida.
- Não utilizar a uréia de Stuart porque é menos sensível para detectar a presença de urease.
- Não deixar o meio em temperatura ambiente pode ocorrer autohidrólise.

5. FÓRMULAS E PRODUTOS PARA PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

PARA PROVA DE CATALASE

PRINCÍPIO

- A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio.

UTILIDADE

- Para *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Moraxella catarrhalis*.

FÓRMULA/ PRODUTO

- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 3%.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ou *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.
- Negativo: cepa de *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- peróxido de hidrogênio deve ser mantido em local seco, ao abrigo de luz e calor.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

INOCULAÇÃO

- Colocar uma gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 3% sobre uma lâmina;
- Com auxílio de fio bacteriológico, agregar a colônia em estudo na gota de peróxido de hidrogênio.

INTERPRETAÇÃO

- Positivo: Presença imediata de bolhas - a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso.
- Negativo: Ausência de bolhas ou efervescência.

RECOMENDAÇÕES

- Evitar o uso de meios contendo sangue, pois os eritrócitos podem produzir reação fraca de catalase.
- Para uso de outra cepa de *Staphylococcus* para o controle positivo, não usar cepas de *Staphylococcus saccharolyticus* e *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, pois são catalase negativos.

PARA PROVA DE COAGULASE

PRINCÍPIO

- Verificar a capacidade de microrganismos reagirem com o plasma e formarem um coágulo, uma vez que a coagulase é uma proteína com atividade similar à protombrina, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação de um coágulo visível.
- Pode ser encontrada em duas formas que possuem diferentes propriedades: coagulase conjugada e coagulase livre.
- **A coagulase conjugada** (prova em lâmina), é também conhecida como fator de aglutinação, encontra-se unida à parede celular bacteriana e não está presente em filtrados de cultivos.

Quando as células bacterianas são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas, o que causa agrupamento sob a forma de grumos visíveis.

- **A coagulase livre** (prova em tubo), é uma substância similar à trombina e está presente em filtrados de cultivos. É secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominado Fator de Reação com a Coagulase – CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos).
- Quando uma suspensão em plasma do microrganismo produtor de coagulase é preparada em tubo de ensaio, forma-se um coágulo visível após o período de incubação.

UTILIDADE

- Separar as espécies de *Staphylococcus* de importância clínica, *S. aureus* – coagulase positiva, das demais espécies – coagulase negativa.

FÓRMULA / PRODUTO

- Plasma de coelho com EDTA liofilizado.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- plasma antes e depois de reconstituído, deve ser mantido refrigerado.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

INOCULAÇÃO

Coagulase conjugada:

- Traçar dois círculos com lápis de cera em uma lâmina de vidro;
- Colocar duas gotas de água destilada ou solução fisiológica estéreis dentro de cada círculo;
- Com auxílio de um fio bacteriológico agregar a colônia em estudo, homogeneizando delicadamente em cada círculo;
- Colocar uma gota de plasma para a prova de coagulase em um dos círculos;
- No outro círculo, adicionar outra gota de água destilada ou solução fisiológica estéreis, como controle;
- Homogeneizar com palito de madeira;
- Inclinar a lâmina delicadamente, para frente e para trás;
- Observar presença de aglutinação.

Coagulase livre:

- Com auxílio do fio bacteriológico, suspender colônias em estudo em caldo BHI e colocar em estufa à 37°C até que turve;
- Se necessário, acertar a turbidez até 0,5 da escala de MacFarland;
- Em um tubo de ensaio estéril, colocar 0,5 ml de plasma reconstituído e 0,5 ml do caldo BHI com crescimento bacteriano recém turvado;
- Incubar em estufa à 35°C 4 horas;
- Verificar se há presença de coágulo;
- Se não houver presença de coágulo, incubar o tubo em temperatura ambiente e repetir as leituras com 18 e 24 horas de incubação.

INTERPRETAÇÃO

Coagulase conjugada:

- Positiva: formação de precipitado branco e aglutinação dos microrganismos da suspensão, após 15 segundos, no círculo que contém o plasma.
- Negativa: ausência de aglutinação no círculo que contém o plasma.
- Controle sem plasma: deverá ser leitoso e uniforme, sem presença de precipitado ou aglutinação. A presença de precipitado ou aglutinação, torna a prova inespecífica, devendo ser repetida a prova em tubo.

Coagulase livre:

- Positiva: presença de qualquer grau de coágulo.
- Negativa: ausência de coágulo.

RECOMENDAÇÕES

- Para a coagulase em tubo, as provas negativas após 4 horas a 37°C, os tubos devem ser mantidos em temperatura ambiente, pois a incubação prolongada a 37°C podem produzir fibronolisinas, o que causa dissolução do coágulo durante a incubação.
- Durante a leitura inclinar o tubo delicadamente e não agitar, pois a agitação pode desmanchar os coágulos parcialmente formados.
- Recomenda-se o uso de plasma de coelho com EDTA.
- Não utilizar plasma citratado, pois os microrganismos capazes de metabolizar o citrato (como os *Enterococcus*), darão resultados positivos se, forem confundidos com estafilococos.
- Plasma humano não é recomendado, pois contém quantidades variadas de Fator de Reação com a Coagulase e de anticorpos antiestafilococos, podendo dar uma prova falso/ negativa.

PARA PROVA DE GELATINASE

PRINCÍPIO

- Determina a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas (gelatinases) que liquefaz/hidrolisa gelatina.

UTILIDADE

- Identificar e classificar bactérias fermentadoras, não fermentadoras e bacilos Gram positivos esporulados.

FÓRMULA / PRODUTO

- Filme não revelado de Raio X.
- Salina 0,9 % estéril ou água destilada estéril.

PROCEDIMENTOS

- Cortar a fita de filme de Raio X em tamanhos de aproximadamente 5 mm X 1 cm;
- Armazenar em frasco estéril.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

INOCULAÇÃO

- Em um tubo 13 x 100 mm, colocar 1,0 ml de salina 0,9% estéril ou água destilada estéril.;
- Com o auxílio de uma alça bacteriológica, fazer um inóculo denso da bactéria a ser testada, adicionar uma fita de raio x. Fazer o inóculo de colônias de crescimento de 18 a 24 horas;

- Realizar um tubo controle, com salina 0,9% estéril ou água destilada estéril e a fita de Raio X, sem inóculo.

INTERPRETAÇÃO

- Positivo: emulsão de gelatina (cor verde) na porção submersa do filme torna-se transparente (clara).
- Negativo: fita permanece verde, emulsão esverdeada permanece na porção submersa do filme.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Fitas: seguir instruções do fabricante.

RECOMENDAÇÕES

- Utilizar filme de Raio X não revelado.

PARA PROVA DE LECITINASE

PRINCÍPIO

- Cepas produtoras de lecitinase produzem zona opaca ao redor do inóculo.

UTILIDADE

- Diferenciação de espécies de *Bacillus* e *Clostridium*.

FÓRMULA / PRODUTO

Fórmula - meio base:

Gema de ovo de galinha	depende do volume de meio base à ser utilizado
Proteose de peptona nº 2	40 g
Fosfato dissódico	5 g
Fosfato de potássio	1 g
Cloreto de sódio	2 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Glicose	2 g
Solução de hemina (5 mg/ ml)	1 ml
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

pH: 7,6

Solução de gema de ovo à 50%:

Gema de ovo	1 ml
Solução fisiológica estéril	1 ml

PROCEDIMENTOS

Meio base:

- Pesar e hidratar todos os componentes, exceto a solução de gema de ovo;
- Aquecer em bico de Bunsen até fundir o ágar;
- Distribuir 20 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.

Meio para uso:

- Resfriar a 50°C e adicionar 1 ml da solução de gema de ovo a 50%;
- Homogeneizar bem e distribuir em placas de Petri de 90 mm.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* ATCC 13124.
- Negativo: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium difficile* ATCC 9689.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Meio base (para estoque): 4 a 8°C fechado, durante 6 meses.
- Meio para uso: 4 a 8°C, embalado, durante 1 semana.

INOCULAÇÃO

- Com auxílio de um fio bacteriológico, tocar nas colônias em estudo e fazer um esfregaço circular e denso sobre a superfície do meio.
- Incubar à 37°C 24 horas em aerobiose - para cepas de *Bacillus* spp.;
- Incubar à 37°C 48 horas em anaerobiose - para cepas de *Clostridium* spp.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo.
- Positivo: formação de halo branco ao redor das colônias.
- Negativo: ausência de halo, meio fica inalterado.

RECOMENDAÇÕES

- Não usar ovos velhos.
- Não usar meio vencido.

PARA PROVA DE OXIDASE

PRINCÍPIO

- O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria.

UTILIDADE

- Ajuda caracterizar espécies de *Neisseria*, distingue não fermentadores (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa). Diferencia algumas bactérias fermentadoras oxidase positiva entre elas *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas* spp. e *Vibrio* spp.

FÓRMULA / PRODUTO

- Reativo para teste de oxidase preparado no laboratório:
 - N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato 1g
 - Água destilada 100 ml
- Tiras impregnadas com o reativo (comercial pronto para uso).
- Reativo de oxidase em ampolas (comercial pronto para uso), para ser revelado em papel de filtro.

PROCEDIMENTOS

Reativo para teste de oxidase:

- Pesar 1g. de N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno diamina mono-hidrocloridrato em um Becker e adicionar 100 ml água destilada, vagarosamente para não oxidar a solução;
- Colocar o papel de filtro cortado em tiras dentro do Becker com o reativo;
- Deixar o papel de filtro absorver o reativo. Desprezar o reativo que sobrou;
- Colocar o papel na estufa a 35 ±1°C para secar. Deixar o papel pendurado sobre um Becker para juntar o excesso de reativo;
- Cortar a fita em tamanhos menores e guardar em frasco escuro.

Obs: Não utilizar luvas para fazer o procedimento de preparo e corte das fitas.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (desenvolvimento de cor roxa).
- Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (sem alteração da cor).

INOCULAÇÃO

- Com auxílio de um palito de madeira ou plástico, espalhar a colônia a ser testada sobre a fita de oxidase.
- **Observar se há formação de cor roxa de imediato.**

INTERPRETAÇÃO

- Cor original: branca ou levemente azulada
- Oxidase positiva: produção de cor roxa imediatamente no local da inoculação da bactéria.
- Oxidase negativa: não há mudança da cor do papel no local da inoculação da bactéria.
- **Não considerar alteração de cor tardia.**

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Fitas: 3 meses, quando conservadas em frasco escuro de 4 a 8°C.
- Reativo: deve ser preparado no momento de impregnar as fitas.

RECOMENDAÇÕES

- Não fazer o teste de colônias de crescimento de meios que contenham glicose, a fermentação inibe a atividade da oxidase, podendo resultar em falso negativo.
- Não fazer teste de oxidase de colônias de crescimento de meios seletivos (Mac Conkey, XLD, EMB).
- Não usar alça ou agulha porque pode conter traços de ferro, podendo oxidar a fita e resultar em falso positivo.
- Utilizar colônias de meios não seletivos tais como: ágar sangue e ágar chocolate.
- Os reagentes para oxidase, se auto oxidam rapidamente com o ar, perdendo a sensibilidade.
- Não cortar o papel de filtro com tesoura, pois podem conter traços de ferro.

PARA FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

PRINCÍPIO

- A fermentação de carboidratos é amplamente utilizada para a diferenciação de gêneros e identificação de espécies bacterianas.
- A prova consiste em verificar a capacidade do microrganismo fermentar ou não um determinado carboidrato, permitindo assim verificar as suas características que auxiliaram na identificação.

UTILIDADE

- Identificar e separar espécies de *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase negativa*.

FÓRMULA/ PRODUTO

- Produto: Caldo para fermentação de carboidratos.
- Carboidratos mais utilizados: arabinose, sorbitol, rafinose, trealose, manitol, entre outros.
- Fórmula (base):

BHI caldo	22,5 g	Carboidrato	10 g
Indicador *	1 ml	Água destilada	200 ml
Água destilada	900 ml		

* Indicador púrpura de bromocresol:

Púrpura de bromocresol	1,6 g
Etanol a 95%	100 ml

PROCEDIMENTOS

- Esterilizar os carboidratos, separadamente, por filtração e reservar;
- Pesar o BHI em béquer, acrescentar a água e homogeneizar bem;
- Adicionar o indicador e homogeneizar novamente;
- Esterilizar em autoclave;
- Após esfriar a base, adicionar o carboidrato esterilizado por filtração;
- Distribuir 3 ml por tubo.

CONTROLE DE QUALIDADE

CARBOIDRATOS	POSITIVO	NEGATIVO
Arabinose	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Rafinose	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Sorbitol	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
Maltose	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
Trealose	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar entre 4 a 10 °C por 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Dissolver as colônias no caldo;
- Incubar à 35°C 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: púrpura
- Positivo: Crescimento bacteriano (turvação do meio) com viragem do indicador para amarelo;
- Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, púrpura e sem turvação.

RECOMENDAÇÕES

- Para provas negativas, incubar um período maior (48 horas);
- Não autoclavar a base com o carboidrato, pois a alta temperatura pode degradar o carboidrato.

PARA A PROVA DE HIDRÓLISE

PRINCÍPIO

- A prova de hidrólise PYR é um teste enzimático que consiste na hidrólise do substrato L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide por uma enzima bacteriana, a L-pyroglyutamyl-aminopeptidase. A hidrólise do substrato libera β-naphtylamide, que é detectada com a adição do reagente, o N,N-dimetilaminocinamaldeído, que forma uma base de Schiff, de coloração vermelha.

UTILIDADE

- Teste presuntivo para identificar *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (S. pyogenes)* e *Enterococcus spp.*
- Identificação de algumas espécies *Staphylococcus coagulase negativa*.
- Identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores.

FÓRMULA / PRODUTO

- Teste comercial : PYR test
- Fórmula - Caldo base de PYR (caldo de Todd-Hewitt):

- BHI caldo	500 g
- Neopeptona	20 g
- Dextrose	2 g
- Cloreto de sódio	2 g
- Fosfato dissódico	0,4 g
- Carbonato de sódio	2,5 g
- Água destilada	1000 ml

Para cada 100 ml de caldo base, adicionar 0,01 ml de L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide.

Reagente de PYR comercial: N,N-dimetilaminocinamaldeído a 0,01%

PROCEDIMENTOS

- Pesar os componentes em béquer;
- Adicionar a água e homogeneizar bem até completa dissolução;
- Adicionar o L-pyrrolidonyl-alfa-naftylamide e homogeneizar novamente;
- Distribuir 0,2 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (S. pyogenes ATCC 19615)* ou *Enterococcus faecalis ATCC 29212*.
- Negativo: *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae*.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.
- Comercial: ver instruções do fabricante

INOCULAÇÃO

- Dissolver as colônias no caldo OU;
- No caso de usar kits comerciais, com auxílio de uma pinça flambada, colocar um disco impregnado com o substrato de PYR sobre as colônias em estudo recém isoladas;
- Incubar à 37°C por 4 horas;
- Adicionar 1 gota do reagente PYR (se caldo) OU;
- Retirar o disco e colocar sobre uma lâmina e adicionar 1 gota do reagente PYR.

INTERPRETAÇÃO

- Positivo: Desenvolvimento de cor vermelho cereja em 1 minuto (após adicionar o reagente de PYR).
- Negativo: Sem alteração de cor (permanece amarela ou alaranjada).

RECOMENDAÇÕES

- Para identificações presuntivas do *Streptococcus pyogenes* ou de *Enterococcus spp.*, confirmar se realmente são cocos Gram positivos/ catalase negativos, pois algumas cepas de *Staphylococcus spp.*, *Aerococos* e *Arcanobacterium haemolyticum*, podem ser PYR positivos
- Raras cepas de *Enterococcus spp.* podem ser catalase positiva, confirmar com outras provas (como bÍlis esculina) tratar de enterococo ou não;
- Não utilizar colônias com crescimento superior a 24 horas, culturas velhas podem dar resultado falso - negativo;
- Não exceder o tempo de leitura.

PARA CRESCIMENTO A 42 E 44°C

PRINCÍPIO

- Verificar a capacidade do microrganismo crescer em altas temperaturas.

UTILIDADE

- Identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Caldo BHI (infusão de cérebro e coração).
- Indicador púrpura de bromotimol (1,6 g de do indicador em 100 ml de álcool etílico 95%).

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Distribuir 3,0 ml em tubos com tampa de rosca;
- Acrescentar o indicador púrpura de bromotimol (1 ml de indicador em 1000 ml de meio);
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Temperatura 42°C: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Temperatura 44°C: *Acinetobacter baumannii*.

INOCULAÇÃO

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular a colônia a ser testada;
- Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas;
- Incubar em banho Maria na temperatura a ser testada, 42°C ou 44°C.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: púrpura.
- Positivo: presença de turvação e viragem do indicador de cor púrpura para amarelo = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação e permanência da cor púrpura = ausência de crescimento bacteriano.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar por até 6 meses de 2 a 8°C.

RECOMENDAÇÕES

- Não fazer inóculo muito denso, pode resultar em falsa turvação.
- Importante o controle da temperatura do banho, com termômetro de máxima e mínima.

PARA TESTE DE MOTILIDADE

PRINCÍPIO

- A bactéria é móvel através do seu flagelo. Flagelos ocorrem nos bacilos Gram negativos, poucas formas de cocos são móveis. A bactéria pode conter um ou muitos flagelos e sua localização varia com a espécie da bactéria e as condições de cultura.

UTILIDADE

- Determinar se o microrganismo é o não móvel;
- Meios associados a outros testes: Meios SIM (Sulfato, Indol, Motilidade), MILI (Motilidade, Indol, Lisina), MIO (Motilidade, Indol, Ornitina) utilizados para testes enterobactérias;

- Meio motilidade em caldo utilizado para não fermentadores e *Enterobacter cloacae* (em casos de dúvidas).

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Motilidade
- Meio comercial: SIM
- Meio comercial: MILI
- Meio comercial: MIO
- Meio Comercial: BHI (brain heart infusion)
- Meio Comercial: Triptona
- Solução de Vermelho de Tetrazólio.

PROCEDIMENTOS

Meio Motilidade:

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 2,0 ml em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

Meio Motilidade com adição da solução de Vermelho de Tetrazólio:

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Adicionar 0,1 ml para cada 100 ml de base de solução de vermelho de tetrazólio 0,1% e homogeneizar bem;
- Distribuir aproximadamente 2,0 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

Meio SIM /Meio MILI/Meio MIO

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 3,0 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave.
- Deixar solidificar em temperatura ambiente na posição vertical.

Caldo BHI (motilidade em caldo)

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Distribuir 3,0 ml em tubos com tampa de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente.

Meio Caldo Triptona

- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante;
- Aquecer sob agitação, até fundir o meio;
- Distribuir aproximadamente 3,0 ml em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

Meio Motilidade:

- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Meio SIM:

Microrganismo	H ₂ S	Indol	Motilidade
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	neg	neg	neg
<i>Escherichia coli</i>	neg	+	+

Proteus vulgaris ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Escherichia coli* ATCC 25922

Meio MIO:

Microrganismo	Motilidade	Indol	Ornitina
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	neg	neg	neg
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	neg	+	+

Escherichia coli ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

Meio MILI:

Microrganismo	Crescimento	Lisina	Motilidade	Indol
<i>E. coli</i>	denso	+	+	neg
<i>K. pneum.</i>	denso	+	neg	neg
<i>P. alcalifaciens</i>	denso	neg	+	neg
<i>S. enteritidis</i>	denso	+	+	neg
<i>S. flexneri</i>	denso	neg	neg	neg

E. coli ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Providencia alcalifaciens* ATCC 9886, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella flexneri* ATCC 12022

Meio BHI/Caldo Triptona:

- Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Negativo: meio sem inocular.

INOCULAÇÃO

Meio Motilidade / Meio SIM / Meio MILI / Meio MIO

- Com o auxílio de um fio bacteriológico inocular uma colônia pura de 18 – 24 horas, no meio na posição vertical, lentamente até a base;
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial da incubação;
- Incubar a 35°C por 18-24 horas.

Meio Caldo BHI / Meio Caldo Triptona

- Com o auxílio de uma alça ou fio bacteriológico, inocular colônia pura de 18 a 24 horas;
- Incubar a 35±2°C por 24 a 48 horas.

INTERPRETAÇÃO

Meio de Motilidade:

- Motilidade positiva: organismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio, causando turbidez.
- Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha de inóculo, em volta continua límpido.

Meio de Motilidade com Tetrazólio:

- Motilidade positiva: organismos móveis produzem uma nuvem cor pink e difundem-se completamente no meio.
- Motilidade negativa: há crescimento da bactéria e produção de cor vermelho claro na linha do inóculo e em volta do meio continua límpido.
- Se resultado for negativo incubar a 21-25°C por até 5 dias.

Revelação com reativo de Kovacs no meio SIM:

- Realizar a leitura da motilidade e do H₂S.

- Em seguida adicionar 5 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo no meio contendo o crescimento bacteriano. **Agitar otubo suavemente** e proceder a leitura do indol.
 - Motilidade positiva: microrganismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez;
 - Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido;
 - H₂S positivo: ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra;
 - H₂S negativo: linha ao longo da inoculação inalterada;
 - Indol positivo aparecerá um anel vermelho;
 - Indol negativo permanecerá um anel amarelo (cor original do reativo de Kovacs);

Meio MILI

- Interpretar as reações da motilidade e lisina antes da adição do reagente de Kovacs para detecção do indol.
 - Motilidade positiva: indicado pelo crescimento na linha e em volta do inóculo.
 - Motilidade negativa: crescimento somente na linha do inóculo.
 - Lisina decarboxilase positiva: indicado pela cor púrpura no meio (essa cor pode variar de intensa ou mais leve, de acordo com a redução do indicador).
 - Lisina decarboxilase negativa: indicado pela cor amarela do meio.
 - Indol positivo: indicado pela formação de cor pink/vermelho, após a adição de 3 a 4 gotas de reagente de Kovacs na superfície do meio e agitação suave no tubo.
 - Indol negativo: reação negativa é indicada pelo desenvolvimento de cor amarela.

Meio MIO

- Interpretar as reações da motilidade e ornitina antes da adição do reagente de Kovacs para detecção do indol.
 - Motilidade positiva: indicado pelo crescimento na linha e em volta do inóculo.
 - Motilidade negativa: crescimento somente na linha do inóculo.
 - Ornitina decarboxilase positiva: indicado pela cor púrpura no meio.
 - Ornitina decarboxilase negativa: indicado pela cor amarela no meio.
 - Indol positivo: indicado pela formação de cor pink/vermelho, após a adição de 3 a 4 gotas de reagente de Kovacs na superfície do meio e agitação suave no tubo.
 - Indol negativo: reação negativa é indicada pelo aparecimento da cor amarela.

Meio caldo BHI/ Meio Caldo Triptona

- Colocar uma gota do meio entre lâmina e lamínula e observar ao microscópio com objetiva de 40 X. A motilidade verdadeira deve ser diferenciada do movimento "browniano", verificando que o microrganismo se desloca em várias direções.
 - Motilidade positiva: bactérias se movendo de um lado para outro.
 - Motilidade negativa: bactéria apresenta somente movimento "browniano".

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Meios motilidade, SIM, MILI, MIO e BHI: conservar de 4 a 8° C por até 6 meses.

RECOMENDAÇÕES

- A temperatura de incubação é extremamente crítica, porque muitos microrganismos são móveis a 15-25°C e não móveis a 37°C. Se houver suspeita que o microrganismo pode exibir motilidade em baixa temperatura, inocular dois tubos simultaneamente, incubando um a 35°C e outro a temperatura ambiente 22-25°C.
- Uso do sal de tetrazólio no meio de motilidade é desejável, mas pode inibir certos microrganismos fastidiosos.

- Flagelo é o órgão locomotor e é composto de proteína, essa proteína pode se desnaturar com excesso de calor. Por isso cultura testada em temperaturas acima do indicado para o teste de motilidade pode fornecer um resultado falso negativo.
- Flagelo pode ser destruído também sob agitação violenta do tubo de cultura da bactéria, podendo produzir um resultado de motilidade fraco positivo ou falso negativo.
- Microrganismos mantidos em estoques de cultura em meios artificiais por longos períodos tendem a perder sua motilidade.
- Os testes de motilidade em aneróbios são difíceis de serem interpretados, sendo significativos apenas os resultados positivos.

PARA PROVA DE TOLERÂNCIA AO NaCl 6,5%

PRINCÍPIO

- A tolerância ao NaCl a 6,5% é uma prova utilizada para verificar a capacidade de alguns microrganismos crescerem em presença do sal.
- Meio base utilizado é o BHI caldo, que é um meio nutritivo de uso geral, empregado para o cultivo de muitas bactérias. Este meio normalmente contém 0,5 % de NaCl e aumenta-se a concentração para 6,5 %, tornando um meio semi-seletivo para o desenvolvimento de alguns microrganismos.

UTILIDADE

- Separa *Enterococcus* spp., que são NaCl 6,5 % positivo dos demais *Streptococcus* spp., que são NaCl 6,5% negativos.
- Na identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores.

FÓRMULA / PRODUTO

- Não há meio pronto para uso.
- **Fórmula:**

BHI caldo	25 g
NaCl	60 g
Indicador *	1 ml
Glicose	1 g
Água destilada	1000 ml

* Indicador púrpura de bromocresol:
 Púrpura de bromocresol 1,6 g
 Etanol a 95% 100 ml

Observação: o uso de indicador é opcional.

PROCEDIMENTOS

- Pesar o BHI, o NaCl e a glicose em um béquer;
- Adicionar a água e homogeneizar bem até completa dissolução;
- Adicionar o indicador e homogeneizar novamente;
- Distribuir 3 ml por tubo;
- Esterilizar em autoclave.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou *Enterococcus faecium*
- Negativo: *Streptococcus do grupo viridans* ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

INOCULAÇÃO

- Dissolver as colônias no caldo;
- Incubar.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo.
- Positivo: Crescimento bacteriano (turvação do meio) com ou sem viragem do indicador.
- Negativo: Ausência de crescimento. O meio permanece com a cor original, púrpura e sem turvação.

RECOMENDAÇÕES

- Provas negativas com 24 horas de incubação, recomenda-se período de incubação maior (48 horas);
- Verificar a quantidade de NaCl contido na fórmula do meio de BHI, pois a concentração poderá ser outra, dependendo do fabricante do meio, e a concentração final do meio de NaCl a 6,5 % poderá ser superior ou inferior à concentração desejada;
- Não carregar no inóculo, pois o excesso poderá ser interpretado como crescimento e dar resultados falso - positivos (para os meios utilizados sem o indicador);
- Antes da leitura, agitar delicadamente o tubo, pois pode haver sedimentação das células bacterianas formadas;

Os *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo B de Lancefield (S. agalactiae)* e ocasionalmente os *Streptococcus beta hemolítico presumível do grupo A de Lancefield (S. pyogenes)* podem ser tolerantes ao NaCl 6,5%. Utilizar outras provas para confirmar a identificação destas espécies.

6. DISCOS PARA IDENTIFICAÇÃO

BACITRACINA

PRINCÍPIO

- *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A são sensíveis a concentrações baixas de bacitracina.

UTILIDADE

- Identificação presuntiva de *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A (*S. pyogenes*).

PRODUTO

- Discos de bacitracina de 0,04 unidades/ disco.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo (Sensível): *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
- Negativo (Resistente): *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Manter à 4°C.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

INOCULAÇÃO

- À partir de caldo BHI ou TSB recém turvado, semear na superfície do meio Mueller hinton sangue, com auxílio do "swab";
- Colocar um disco de bacitracina e pressionar levemente;
- Incubar à 35°C 18 a 24 horas.

INTERPRETAÇÃO

- Positivo (Sensível): Presença de qualquer halo ao redor do disco.
- Negativo (Resistente): ausência de halo ao redor do disco.

RECOMENDAÇÕES

- *Streptococcus* alfa hemolíticos são sensíveis a baixas concentrações de bacitracina.
- Não existem dados disponíveis que indiquem a necessidade de medir os halos de inibição.
- O inóculo bacteriano deve ser confluyente, inóculo muito diluído pode permitir que os *Streptococcus* não pertencentes ao grupo A pareçam sensíveis à bacitracina.

NOVOBIOCINA

PRINCÍPIO

- Separa espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa que podem ser sensíveis ou não a Novobiocina.

UTILIDADE

- Separa cepas de *Staphylococcus saprophyticus* (Novobiocina resistente) das demais cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa de importância clínica; *Staphylococcus saprophyticus* é a única espécie isolada em humanos como causadora de infecções urinárias.

FÓRMULA / PRODUTO

- Discos de Novobiocina de 5 µg.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.
- Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Refrigerado.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

INOCULAÇÃO

- Preparar uma suspensão do microrganismo em estudo com crescimento recente (até 24 horas) em caldo BHI, TSA ou solução fisiológica estéril, acertando a turvação na escala 0,5 de MacFarland;
- Com auxílio de um "swab", semear na superfície de uma placa de Ágar Mueller Hinton;
- Com uma pinça previamente flambada, colocar um disco de Novobiocina na superfície do meio e pressionar delicadamente;
- Incubar.

INTERPRETAÇÃO

- Resistente: Ausência de halo de inibição ou halos ≤ 15 mm.
- Sensível: Presença de halo de inibição igual ou superior a 16 mm.

RECOMENDAÇÕES

- Não usar cepas velhas (com crescimento superior a 24 horas) para fazer a suspensão;
- Se necessário usar cepas velhas, semear em caldo BHI ou TSA e incubar à 37°C até turvar, acertar a turvação na escala 0,5 de MacFarland para fazer o teste;
- Cepas isoladas de outros materiais biológicos que não urina, fazer identificação complementar com fermentação de açúcares para confirmar espécie.

OPTOQUINA

PRINCÍPIO

- Cloridrato de etil-hidroxipreína (optoquina), um derivado da quinina, inibe de forma seletiva o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em concentrações muito baixas (5 µg/ ml ou menores).
- As células do *Streptococcus pneumoniae* que rodeiam o disco sofrem lise, devido à variação da tensão superficial, e é produzida uma área de inibição.

UTILIDADE

- Separa *Streptococcus pneumoniae* dos demais *Streptococcus* alfa hemolíticos.

FÓRMULA / PRODUTO

- Discos de optoquina de 5 µg

CONTROLE DE QUALIDADE

- Positivo (Sensível): *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305.
- Negativo(Resistente): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Manter à 4°C.
- Validade: ver recomendações do fabricante.

INOCULAÇÃO

- À partir de caldo BHI ou TSB recém turvado, semear na superfície do meio Mueller hinton sangue, com auxílio do "swab";
- Colocar um disco de optoquina e pressionar levemente;
- Incubar à 35°C 18 a 24 horas em jarra com vela acesa ou estufa com 5 a 7 de CO₂.

INTERPRETAÇÃO

Positivo (Sensível):

- Disco de 6 mm: halo de inibição de 14 mm ou mais.
- Disco de 10 mm: halo de inibição de 16 mm ou mais.

Negativo (Resistente):

- Disco de 6 mm: halo de inibição inferior à 14 mm ou ausência de halo.
- Disco de 10 mm: halo de inibição inferior à 16 mm ou ausência de halo.

RECOMENDAÇÕES

A optoquina pode inibir outros *Streptococcus do grupo viridans*, mas apenas em concentrações muito elevadas.

7. MEIOS PARA TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

HTM – HAEMOPHILUS TEST MÉDIUM

PRINCÍPIO

- É um meio suplementado que permite o crescimento das espécies mais exigentes de *Haemophilus*, pois contém em sua fórmula suplementos à base de NAD e cisteína.

UTILIDADE

- Meio padronizado pelo NCCLS para realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos de *Haemophilus influenzae*.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial HTM
- Suplemento VX: NAD (Coenzima I) e cisteína.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante em um balão de fundo chato;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar o meio a 50°C e adicionar o suplemento previamente reidratado;
- Distribuir 50 a 60 ml em placas estéreis de 150 mm (o meio deve ficar com uma espessura homogênea de 3 a 4 mm);
- Deixar esfriar à temperatura ambiente.

CONTROLE DE QUALIDADE

Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 na escala 0,5 de Mac Farland;
- Diluir 1:100 (0,1mL em 9,9 ml de solução fisiológica);
- Semear 0,01 ml da suspensão na placa;
- Incubar a placa 35 ±2°C por 24 horas em estufa com 5% de CO².
- Se a bactéria crescer em 24 horas, liberar o lote para uso.

Obs: A aprovação final do meio deve ser feita após os testes com antibióticos, uma vez que inúmeras variáveis como níveis de timina, timidina só podem ser verificadas após o teste com os antibióticos ter sido realizado.

INOCULAÇÃO

- Preparar uma suspensão da bactéria a ser testada em salina 0,9% ou caldo TSB na escala 0,5 Mac Farland;
- Embeber o "swab" na suspensão, comprimí-lo na parede do tubo (para eliminar o excesso) e semear na placa;
- Acrescentar os discos a serem testados;
- Incubar a placa de acordo com instruções do NCCLS para a bactéria a ser testada.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: castanho escuro.
- A zona do diâmetro é particular para cada droga e organismo, sendo comparado com diâmetros padronizados pelo NCCLS, que determina cada organismo sendo sensível, intermediário ou resistente.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

ÁGAR MUELLER HINTON

PRINCÍPIO

- Ágar padronizado por Kirby e Bauer e pelo NCCLS que oferece condições de crescimento das principais bactérias.

UTILIDADE

- Meio utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e E-test para enterobactérias, não fermentadores, *Staphylococcus*, *Enterococcus sp.*

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Ágar Muller Hinton.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acertar o pH (7,2 – 7,4);
- Retirar da autoclave e medir novamente o pH;
- Distribuir 50 a 60 ml em cada placa de 150 mm;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira (4 a 8°C).

Obs: É extremamente importante que o meio tenha espessura homogênea de 3 a 4 mm.

CONTROLE DE QUALIDADE

Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922 na escala 0,5 de Mac Farland;
- Diluir 1:100 (0,1mL em 9,9 ml de solução fisiológica);
- Semear 0,01 ml da suspensão na placa. Incubar a placa 35°C por 24 horas.

Obs: A aprovação final do meio deve ser feita após os testes com antibióticos, uma vez que inúmeras variáveis como níveis de timina, timidina, de cálcio e magnésio só podem ser verificadas após o teste com os antibióticos ter sido realizado.

INOCULAÇÃO

- Preparar uma suspensão da bactéria a ser testada em salina 0,9% ou caldo TSB na escala 0,5 Mac Farland;
- Embeber o "swab" na suspensão, comprimí-lo na parede do tubo (para eliminar o excesso) e semear na placa;
- Acrescentar os discos a serem testados;
- Incubar a placa de acordo com instruções do NCCLS para a bactéria a ser testada.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: amarelo palha.
- A zona do diâmetro é particular para cada droga e organismo, sendo comparado com diâmetros padronizados pelo NCCLS, que determina cada microrganismo sendo sensível, intermediário ou resistente.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar embalado de 4 a 8°C por até 3 meses.

RECOMENDAÇÕES

Principais variáveis que podem interferir no resultado do antibiograma:

- Níveis de Ca²⁺, Mg²⁺ : altas concentrações levam a diminuição na atividade de aminoglicosídeos diante de *Pseudomonas aeruginosa* e da atividade de tetraciclina para todas as bactérias. Concentrações diminuídas levam a resultados contrários.
- Concentração de timidina ou timina: concentrações em excesso levam à falsa resistência para sulfonamidas e trimetoprima.
- pH: em pH baixo vamos observar halos de inibição reduzidos para aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos e lincosaminas e halos aumentados para outros antibióticos (penicilina e tetraciclina). O aumento do pH leva a resultados opostos aos anteriores.
- Espessura do meio: < 3 mm leva à falsa sensibilidade geral e > 4 mm leva à falsa resistência.

ÁGAR MUELLER HINTON SANGUE

PRINCÍPIO

- Ágar padronizado por Kirby e Bauer e pelo NCCLS que oferece condições de crescimento das principais bactérias.

UTILIDADE

- Meio utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e E-test de cepas de *Streptococcus pneumoniae* e estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A,B,C e G conforme instruções do NCCLS.

FÓRMULA / PRODUTO

- Meio comercial: Ágar Muller Hinton.
- Sangue de carneiro desfibrinado.

PROCEDIMENTOS

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;
- Acertar o pH (7,2 – 7,4);
- Retirar da autoclave e resfriar a 50°C;
- Adicionar 50 ml de sangue de carneiro desfibrinado por litro de meio de cultura de forma asséptica;
- Homogeneizar bem sem formar espuma;
- Distribuir 50 a 60 ml em cada placa de 150 mm;
- Deixar esfriar em temperatura ambiente;
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

Obs: É extremamente importante que o meio tenha espessura homogênea de 3 a 4 mm.

CONTROLE DE QUALIDADE

Crescimento:

- Preparar uma suspensão de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 na escala 0,5 de Mac Farland;
- Diluir 1:100 (0,1 ml em 9,9 ml de solução fisiológica);
- Semear 0,01 ml da suspensão na placa;
- Incubar a placa 35°C por 20 a 24 horas com 5% de CO₂.
- Se a bactéria crescer em 24 horas, o lote está pronto para uso.

Obs: A aprovação final do meio deve ser feita após os testes com antibióticos, uma vez que inúmeras variáveis como níveis de timina, timidina, de cálcio e magnésio só podem ser verificadas após o teste com os antibióticos ter sido realizado.

INOCULAÇÃO

- Preparar uma suspensão da bactéria a ser testada em salina 0,9% ou caldo TSB na escala 0,5 Mac Farland;
- Embeber o "swab" na suspensão, comprimí-lo na parede do tubo (para eliminar o excesso) e semear na placa;

- Acrescentar os discos a serem testados;
- Incubar a placa de acordo com instruções do NCCLS para a bactéria a ser testada.

INTERPRETAÇÃO

- Cor original do meio: vermelho.
- A zona do diâmetro é particular para cada droga e organismo, sendo comparado com diâmetros do NCCLS, que determina cada microrganismo sendo sensível, intermediário ou resistente.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE

- Conservar de 4 a 8°C por até 3 meses.

RECOMENDAÇÕES

Principais variáveis que podem interferir no resultado do antibiograma:

- Níveis de Ca^{2+} , Mg^{2+} : altas concentrações levam a diminuição na atividade de tetraciclina para todas as bactérias. Concentrações diminuídas levam a resultados contrários.
- Concentração de timidina ou timina: concentrações em excesso levam à falsa resistência para sulfonamidas e trimetoprima.
- pH: em pH baixo vamos observar halos de inibição reduzidos para quinolonas, macrolídeos e lincosaminas e halos aumentados para outros antibióticos (penicilina e tetraciclina). O aumento do pH leva a resultados opostos aos anteriores.
- Espessura do meio: < de 3 mm leva à falsa sensibilidade geral e > 4 mm leva à falsa resistência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Balows A., Hausler, W.J. Jr., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
2. Becton Dickinson and Company. **Manual of BBL products and laboratory procedures**. 6th. Ed., United States of America, 1988.
3. Becton Dickinson and Company. **Product catalog for microbiology 1996/ 1997**, Canada, 1997.
4. Becton Dickinson and Company. **DIFCO manual**. 10th. Ed. Detroit, 1984.
5. Konemen, E.W. Trad. Cury, A.E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5a. Ed., MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.
6. Larone, D.H. **Medically Important Fungi: a guide to identification**. 3rd. Ed., Washington, American Society for Microbiology, 1994.
7. Mc Faddin, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
8. MERCK. **Manual de medios de cultivo**. Darmstadt, 1990.
9. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2a. Ed., Rio de Janeiro, 1994.
10. Murray, P.R., Baron, J.E., Pfaller, A.M., Tenover, C.F. and Tenover, H.R. **Manual of clinical microbiology**. American Society for Microbiology, 7th ed., Washington. DC, 1999.
11. Oplustil, C.P., Zoccoli, C.M., Tobouti, N.R., e Sinto, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**, Sarvier, São Paulo, 2000.
12. Oxoid. **Manual Oxoid**. Espanã, Unipath España, 1995.

Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica

Módulo V

ÍNDICE

1. Estafilococos, estreptococos, enterococos e outros cocos gram positivos	1
Introdução.....	1
Identificação preliminar.....	1
Identificação de estafilococos.....	3
Identificação dos staphylococcus aureus.....	4
Identificação dos estreptococos.....	5
2. Neisserias.....	9
Introdução.....	9
Isolamento	10
Transporte e semeadura do material.....	11
Bacterioscopia e identificação.....	11
3. Enterobactérias.....	14
introdução	14
tipos de testes utilizados para identificação.....	15
etapas da identificação de enterobactérias.....	18
identificação das enterobactérias de importância clínica	19
identificação sorológica	27
4. Bastonetes não fermentadores.....	31
Introdução.....	31
Semeadura, leitura e interpretação das provas de identificação.....	31
Procedimentos para a identificação.....	33
5. Bacilos curvos ou espiralados.....	41
Introdução.....	41
<i>Campylobacter</i>	42
<i>Vibrios, Aeromonas e Plesiomonas</i>	43
6. Bacilos gram positivos.....	45
Introdução.....	45
Corineformes	46
Bacilos gram positivo	50
Bacilos esporulados aeróbios e anaeróbios facultativos.....	52
Actinomicetos	54
7. Fastidiosos	56
Introdução.....	56
<i>Bartonella</i>	58
<i>Bordetella</i>	59
<i>Brucella</i>	60
<i>Francisella tularensis</i>	61
<i>Haemophilus</i>	62
<i>Legionella</i>	64
<i>Pasteurella</i>	65
<i>Actinobacillus</i>	66
<i>Capnocytophaga</i>	68
<i>Eikenella</i>	68
<i>Kingella</i>	68
<i>Cardiobacterium hominis</i>	69
<i>Chromobacterium violaceum</i>	69
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	70
8. Bactérias anaeróbias estritas	71
Introdução.....	71
Coleta de material	73
Transporte do material.....	73
Processamento do material.....	73
Identificação bacteriana	74
Provas de sensibilidade a antimicrobianos.....	77
9. Interpretação de Resultados e laudos	78
Introdução.....	78
Laudo para o trato respiratório superior	79
Laudo para escarro.....	81
Laudo para secreção endotraqueal, lavado traqueal, e lavado brônquico	81
Laudo para lavado brocoalveolar ou escovado brônquico	82
Laudo para pleural.....	84
Laudo para abscesso pulmonar	84
Laudo para ocular.....	84
Laudo para líquido céfalo raquidiano (LCR)	85
Laudo para fezes	85
Laudo para pele, abscessos e feridas	86
Laudo para genital.....	88
Laudo para urina	89
Laudo para sangue	92
10. Referências Bibliográficas	93

1. ESTAFILOCOCOS, ESTREPTOCOCOS, ENTEROCOCOS E OUTROS COCOS GRAM POSITIVOS

INTRODUÇÃO

Os Estafilococos são as bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente. Podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal. No entanto, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção hospitalar, este microrganismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos saudáveis são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, e podem albergar o microrganismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na vagina. A partir destes sítios, o *S. aureus* pode contaminar a pele e membranas mucosas do paciente, objetos inanimados ou outros pacientes por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados.

Já foram descritos no Brasil casos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* parcialmente resistentes aos antibióticos mais potentes como a Vancomicina, e relatos da capacidade que os *Staphylococcus* coagulase negativa tem de desenvolver resistência. Assim há necessidade de uma identificação rápida e eficiente de todos os casos em que estes microrganismos se apresentam.

Os estreptococos foram os maiores causadores de infecção hospitalar na era pré-antibiótica, causando surtos de infecção e morte de puérperas. Apesar de não serem atualmente uma importante causa de infecção hospitalar, provocam, no entanto, doenças muito graves e muitas vezes letais, mesmo em pacientes imunocompetentes, sendo importante o rápido diagnóstico deste agente.

Já os enterococos apresentam importância crescente como causadores de infecção hospitalar, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento destas infecções.

Os Enterococos mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium*, com grande capacidade de colonização de pacientes e de contaminarem superfícies ou equipamentos utilizados em hospitais. Possuem sensibilidade ou resistência variável aos antibióticos chamados glicopeptídeos como a vancomicina e teicoplanina. Existem, atualmente, cepas comensais naturalmente resistentes a vancomicina e que podem ser isoladas de pacientes internados, porém não sendo ainda capazes de causarem surtos, mas que devem ser corretamente identificadas.

IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR

A identificação dos estreptococos e estafilococos é baseada na morfologia que apresentam em meios líquidos. Sendo o estreptococo uma cadeia normalmente longa e os estafilococos mostrando-se em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados.

A identificação presuntiva começa com a inoculação primária na placa de ágar sangue de carneiro que deve ser incubada em 5% de tensão de CO₂ (método da vela ou estufa de CO₂). As colônias de estafilococos são geralmente maiores, convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo podendo apresentar hemólise ou não. Note-se que o desenvolvimento da cor amarelada no *S. aureus* ocorre somente após incubação prolongada (72 h), à temperatura ambiente. As colônias de estreptococos tendem a serem menores (puntiformes), e com halos de hemólise total ou parcial (beta e alfa hemólise). A diferenciação entre os estreptococos e os estafilococos se dá, seguramente, pela prova da catalase.

PROVA DA CATALASE

Com a alça bacteriológica ou com um palito coleta-se o centro de uma colônia suspeita e esfrega-se em uma lamina de vidro. Colocar sobre este esfregaço uma gota de água oxigenada a 3% e observar a formação de bolhas. Para a família Micrococaceae (estafilococos) a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcaceae (estreptococos) é negativa.

Divisão dos cocos Gram positivo pela prova da catalase

Catalase positivos	Catalase negativos
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Planococcus</i> spp.	<i>Aerococcus</i> spp.
<i>Stomatococcus</i> spp.	<i>Gemella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.
	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Stomatococcus</i> spp.

Ao coletar a colônia, não carregar meio de cultura (ágar sangue), que pode acarretar resultados falso-positivos porque o sangue do meio contém catalase. Algumas cepas de enterococos podem dar falsa reação positiva (fazer Gram e ver disposição em cadeias curtas ou aos pares).

Identificação simplificada dos cocos Gram positivo de importância clínica

Gênero	Catalase	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	Tétrade
<i>Staphylococcus</i>	+	neg	+	neg	não	variável
<i>Planococcus</i>	+	+	+	neg	+	variável
<i>Micrococcus</i>	+	neg	+	+	variável	variável
<i>Enterococcus</i>	neg	variável	+	neg	não	não
<i>Streptococcus</i>	neg	neg	variável	neg	não	não
<i>Aerococcus</i>	neg	neg	+	neg	não	+
<i>Stomatococcus</i> *	variável	neg	neg	neg	não	variável

* aderente ao meio

Cocos Gram positivo, Catalase negativa, Motilidade Negativa ¹

Gênero	NaCl 6,5%	Vancomicina	PYR	Bile Esculina	Tétrade
<i>Enterococcus</i>	+	variável	+	+	não
<i>Streptococcus</i>	neg	sensível	neg ²	neg ³	não
<i>Aerococcus</i>	+	sensível	variável	variável	variável
<i>Leuconostoc</i>	variável	resistente	neg	variável	não
<i>Pediococcus</i>	variável	resistente	neg	+	variável
<i>Gemella</i>	neg	sensível	+	neg	não
<i>Stomatococcus</i>	neg	sensível	+	+	variável

¹ *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* são positivos

² *S. pyogenes* é positivo

³ alguns *S. viridans* podem ser positivos

IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS

O teste mais importante na identificação da família Micrococcaceae é a prova da catalase, e esta família é composta de quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. O gênero *Staphylococcus* apresenta 32 espécies, 14 subnegespécies, sendo que somente 15 espécies são encontradas em amostras humanas, e de uma maneira prática, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos de acordo com a resposta ao teste da plasmogalactosidase.

Provas diferenciais dos generos Catalase positivos

Gênero	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	Tétrade
<i>Staphylococcus</i>	neg	+	neg	não	variável
<i>Planococcus</i>	+	+	neg	+	variável
<i>Micrococcus</i>	neg	+	+	+	+
<i>Stomatococcus</i>	neg	neg	neg	não	variável

Identificação das espécies de *Staphylococcus* de maior importância clínica

Espécie	DNase	PYR	Novob.	Uréia	Polimixina	Outras
<i>S. aureus</i>	+	neg	sensível	variável	resistente	pig. amarelo
<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	sensível	+	resistente	
<i>S. lugdunensis</i>	neg	+	sensível	variável	variável	omitina +
<i>S. haemolyticus</i>	neg	+	sensível	neg	sensível	omitina neg
<i>S. saprophyticus</i>	neg	neg	resistente	+	sensível	isolado em urina
<i>S. schleiferi</i>	neg	+	sensível	neg	sensível	Sacarose neg
<i>S. intermedius</i>	+	+	sensível	+	sensível	
<i>S. hyicus</i>	+	neg	sensível	variável	resistente	

Existem cerca de 31 espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa conhecidas, das quais os mais frequentes são:

- *Staphylococcus epidermidis* - causador de infecções de cateteres e próteses e o mais frequente microrganismo encontrado em hemoculturas.
- *Staphylococcus saprophyticus* - causador de infecção urinária em mulheres jovens.
- *Staphylococcus haemolyticus* - importante devido à resistência aumentada aos antimicrobianos, e por ser comumente confundido com o *S. aureus*, pois apresenta hemólise na placa de ágar sangue de carneiro.

TESTE DA RESISTÊNCIA A NOVOBIOCINA

A cepa é semeada de maneira semelhante ao antibiograma em placa de Muller Hinton acrescida de um disco teste de novobiocina contendo 5 µg. As amostras resistentes mostram zonas de inibição de 6 a 12 mm, enquanto as susceptíveis apresentam halos de 16 mm ou mais. As cepas de *Staphylococcus saprophyticus* são resistentes.

Testes da Trealose, Urease e Novobiocina

Espécies	Trealose	Urease	Novobiocina
<i>S. epidermidis</i>	Negativa	Positiva	Sensível
<i>S. haemolyticus</i>	Positiva	Negativa	Sensível
<i>S. saprophyticus</i>	Positiva	Positiva	Resistente

IDENTIFICAÇÃO DOS STAPHYLOCOCCUS AUREUS

A forma mais simples de identificar o *Staphylococcus aureus* é a prova da coagulase que pode ser efetuada em tubo ou em lâmina.

TESTE DA COAGULASE EM LÂMINA

A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante) "clumping factor" na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma causando a coagulação do mesmo.

- Colocar 2 gotas de salina em uma lâmina;
- Emulsionar uma colônia isolada a ser testada;
- Colocar uma gota de plasma e misturar com um palito de plástico ou madeira;
- Observar se há aglutinação em 10 segundos;
- Não se pode executar este teste a partir de um ágar com grande concentração de sal como ágar manitol.

TESTE DA COAGULASE EM TUBO

Este teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. O teste é melhor efetuado se:

- Adicionar 0,1 ml de caldo BHI, incubado por uma noite, com colônia suspeita a um tubo de ensaio com 0,5 ml de plasma;
- Incubar por 4 horas à 35°C em estufa ou banho maria;
- A formação do coágulo é observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90 graus da vertical.

Um método alternativo é a emulsificação desta mesma colônia suspeita em um 0,5 plasma e incubado da mesma forma. Qualquer coágulo indica uma prova positiva, porém não confundir com precipitados ou floculação. O melhor plasma a ser usado é o de coelho com EDTA, não devendo ser usado o plasma humano vindo do banco de sangue.

TESTE DA DNASE

Este teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA, (DNase test agar) obtido comercialmente.

- Adicionar ao meio original azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; o meio adquire uma coloração azul intensa;
- Incubar a 35°C por 24 horas;
- Uma coloração rósea característica ao redor das colônias produtoras de DNase indica a positividade da prova.

O meio adicionado com corante demonstra uma melhor facilidade na leitura, e permite o repique da amostra positiva para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, evitando que se retorne à placa original onde nem sempre as colônias estão bem isoladas.

TESTE DA ENDONUCLEASE

Teste da endonuclease termoestável é efetuado no mesmo meio de DNA.

- Ferver o caldo de cultura com a bactéria suspeita por 15 minutos;
- Colocar ao meio de DNA gotas de caldo de cultura turvo com a colônia suspeita;
- Fazer pequenos orifícios no meio (em placa) utilizando canudos de refrigerante;
- A leitura do teste é semelhante ao da DNase.

Note que este método pode ser efetuado a partir de caldo de hemocultura em que foi observado o crescimento de cocos Gram positivos agrupados.

OUTRAS PROVAS QUE DIFERENCIAM O STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Aglutinação em látex ou em hemácias de carneiro (sorologia). Estes testes geralmente detectam a coagulase livre e alguns apresentam também uma imunoglobulina antiproteína A presente da parede do *Staphylococcus aureus*. Como são disponíveis comercialmente, deve-se seguir as instruções do fabricante.

TESTE DO CRESCIMENTO EM ÁGAR MANITOL

O *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5 % de cloreto de sódio, denominado ágar manitol salgado ou Meio de Chapman. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado.

IDENTIFICAÇÃO DE OUTROS GÊNEROS

A diferenciação entre *Micrococcus sp* e os *Staphylococcus sp* se dá pela coloração de Gram, em que os *Micrococcus* aparecem em tétrades, ou pela pigmentação de suas colônias (amarelas, róseas ou alaranjadas). Alguns não apresentam pigmentos e podem ser diferenciados pela sensibilidade a Bacitracina 0,004 UI, a mesma utilizada na identificação de *Streptococcus pyogenes*, mas utilizando-se a inoculação em ágar Mueller Hinton.

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTREPTOCOCOS

Os estreptococos podem ser diferenciados de acordo com sua aparência na placa de ágar sangue após incubação a 35°C em presença de 5% de CO₂, podendo apresentar: hemólise total (beta), parcial (alfa, de cor esverdeada) ou nenhuma (gama).

A identificação de espécie de estreptococos beta hemolíticos é feita através de aglutinação com soros específicos contra os antígenos de Lancefield (A, B, C, D, F e G), que constitui uma prova rápida, porém não acessível a todos os laboratórios em virtude do elevado custo.

TESTE DA BACITRACINA

É importante notar que as identificações devem ser feitas em ágar sangue sem tensão de CO₂ ou os resultados podem ser conflitantes.

- Semear meia placa de ágar sangue com o estreptococo a ser identificado, como para um antibiograma;
- Colocar o disco de bacitracina 0,004 u como indicado;
- Incubar por uma noite a 35°C sem CO₂;
- Observar qualquer zona de inibição como resultado de sensibilidade.

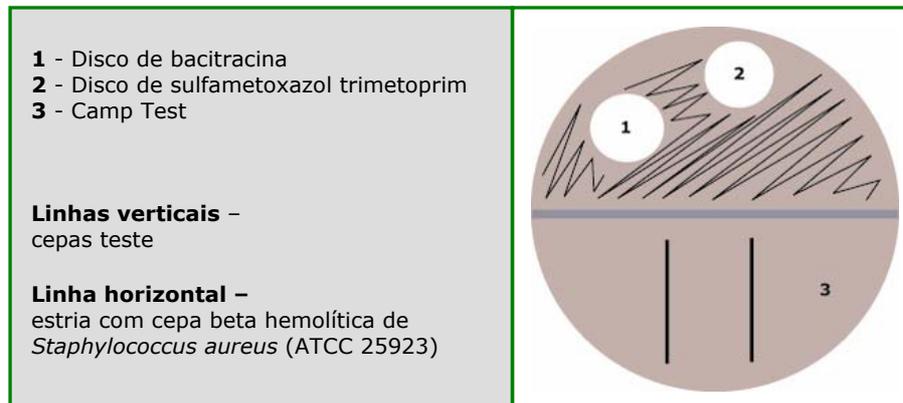
O *Streptococcus pyogenes* (grupo A) é assim rapidamente identificado.

TESTE DO SULFAMETOXAZOL TRIMETOPRIM (SXT)

- Adicionar na mesma placa de ágar sangue o disco de SXT;
- Incubar por uma noite a 35°C sem CO₂.

A sensibilidade a esta droga significa, em conjunto com as outras leituras, que o estreptococo não pertence ao grupo A, B ou D de Lancefield.

- Colocar um disco de Bacitracina 0,004 UI à direita e um de Sulfametoxazol-trimetoprim à esquerda.
- Havendo necessidade, pode ser feito o teste de CAMP na mesma placa, conforme desenho abaixo.



TESTE DE CAMP (NA MESMA PLACA)

- Inocular uma estria única de uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtor de beta lisina (ATCC 25923) no centro de uma placa de ágar sangue preparada obrigatoriamente com sangue de carneiro. (Esta linhagem de *S. aureus* deve ser mantida continuamente em estoque)
- Inocular as amostras a serem testadas em estrias formando um ângulo reto com a linha de inoculação da amostra teste de estafilococo. As estrias não devem se tocar, ficando a 1 mm de distância, e deste modo várias amostras podem ser testadas em uma mesma placa de ágar sangue. A maneira de inocular é fundamental para a observação do efeito esperado.
- Incubar a placa a 35-37°C durante um período de 18-24 horas.
- A positividade da prova, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), é evidenciada pelo alargamento da zona de lise, que adquire a forma de ponta de flecha característica, na área de intersecção entre as duas estrias.

TESTE DO PYR

Este teste determina a atividade do PYR também chamado pyrrolidonyl-aminopeptidase, uma enzima produzida pelo *Streptococcus pyogenes* e também pelo *Enterococcus sp.* Utilizar somente colônias puras para o teste, pois podem surgir resultados errôneos. Seguir as instruções do fabricante, uma vez que se encontra disponível comercialmente.

Esse teste é tecnicamente, equivalente à prova da hidrólise da bile esculina e crescimento em 6,5% de NaCl, usados na identificação clássica dos enterococos, e mais específico que o teste da Bacitracina na caracterização presuntiva dos estreptococos beta hemolíticos do grupo "A", tendo a vantagem de ser mais rápido.

Em qualquer dos dois casos, o PYR constitui uma alternativa importante para esclarecer testes duvidosos. Na impossibilidade da realização de testes sorológicos de confirmação, reforçar o valor dos testes presuntivos clássicos de identificação do *Streptococcus pyogenes*.

TESTE DA BILE ESCULINA E DO NACL 6,5%

- Semear as provas de Bile Esculina e do caldo de NaCl a 6,5%;
- Incubar da mesma forma;
- Teste da bile esculina positiva apresenta cor marrom escuro e o do caldo de NaCl a 6,5 % deve mostrar turvação para ser considerado positivo.

Todos os estreptococos do grupo D de Lancefield apresentam a bile esculina positiva, seja *Enterococcus sp* ou *Streptococcus* do grupo D não enterococo (*Streptococcus bovis*). Quanto ao teste da tolerância ao NaCl a 6,5%, somente os enterococos são positivos.

Identificação de estreptococos beta hemolíticos

Identificação	Sensibilidade a Bacitracina	CAMP /Hidrólise de hipurato	Sensibilidade a SXT	Bile Esculina e Tolerância a NaCl 6,5%
<i>S. pyogenes</i>	sensível	negativo	negativo	negativos
<i>S. agalactiae</i>	resistente	positivo	negativo	negativos
<i>Enterococcus sp</i>	resistente	negativo	negativo	positivos
Estreptococo Não A, B ou D.	resistente	negativo	positivo	negativos

TESTE DA HIDRÓLISE DO HIPURATO

Os *Streptococcus agalactiae* (grupo B) são também capazes de hidrolisar o hipurato em seus componentes: glicina e ácido benzóico. Identificação presuntiva dos estreptococos beta hemolíticos do grupo A, B e D.

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTREPTOCOCOS NÃO BETA HEMOLÍTICOS

Somente os estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) e D (*Enterococcus spp.* e *Streptococcus bovis*) podem não apresentar nenhuma hemólise, a denominada gama hemólise.

Identificação de estreptococos gama hemolíticos ou sem hemólise

Identificação	CAMP /Hidrólise de hipurato	Bile Esculina	Tolerância a NaCl 6,5%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	positivo	negativo	negativo
Enterococo	negativo	positivo	positivo
<i>S. bovis</i>	negativo	positivo	negativo

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTREPTOCOCOS ALFA HEMOLÍTICOS

A identificação deste grupo não deve ser feita por métodos sorológicos, pois a maioria não possui os antígenos de Lancefield.

Identificação dos estreptococos alfa hemolíticos

Identificação	Optoquina e Bile solubilidade	Bile esculina	Tolerância 6,5% a NaCl
Pneumococo	positivo	negativo	negativo
Enterococos	negativo	positivo	positivo
Grupo viridans	negativo	negativo	negativo
<i>Streptococcus bovis</i>	negativo	positivo	negativo

TESTE DA OPTOQUINA

- Semear um quarto de uma placa de ágar sangue com a cepa alfa hemolítica a ser testada;
- Aplicar um disco de optoquina;
- Incubar a 35°C em tensão aumentada de CO₂ - método da vela;
- Uma zona de inibição de 14 mm ou mais à volta de um disco de 6 mm significa sensibilidade e identifica o *Streptococcus pneumoniae*.

TESTE DA BILE SOLUBILIDADE

O teste da bile solubilidade também identifica o *Streptococcus pneumoniae*. Pode ser executado em placa ou em caldo.

Placa:

- Tomar um caldo turvo após 3 horas de incubação a 35°C;
- Inocular uma suspensão de desoxicolato a 10%;
- Clareamento da turbidez reflete a lise bacteriana e confere um resultado positivo à prova.

Caldo:

- Inocular gotas de desoxicolato de Sódio a 2% sobre as colônias suspeitas;
- Incubar a 35°C por 30 minutos;
- As colônias positivas irão desaparecer por lise bacteriana.

Suspeitar da presença de "variante nutricional de *Streptococcus*" destes microrganismos quando o Gram de amostras positivas de hemocultura obtidas em meios comerciais mostram cocos em cadeias que não crescem no subcultivo em ágar sangue.

- Semear o repique em ágar sangue;
- Fazer estrias perpendiculares ao sentido da sementeira com *Staphylococcus aureus*, como para a identificação presuntiva de *Haemophilus influenzae*;
- Incubar a 35°C em atmosfera com CO₂.

Identificação dos enterococos mais importantes clinicamente

Espécie	Arabinos	Sorbitol	Crescimento Telurito 0,04%	Motilidade	Pigmento	Vancomicina
<i>E. faecalis</i>	negativo	positivo	positivo	negativa	negativo	variável (s)
<i>E. faecium</i>	positivo	variável	negativo	negativa	negativo	variável
<i>E. casseliflavus</i>	positivo	variável	negativo	positiva	positivo	resistente
<i>E. gallinarum</i>	positivo	negativo	negativo	positiva	negativo	resistente

2. NEISSERIAS

INTRODUÇÃO

As espécies de *Neisseria* tem como característica morfológica serem diplococos Gram negativos mais achatadas nas laterais, dando a forma de rins ou dois grãos de feijão unidos por uma ponte. Apenas a espécie *N. elongata* difere desta morfologia, sendo diplobacilos ou diplococo-bacilo.

Todas neisserias são oxidase positivas e catalase positivas, exceto *Neisseria elongata* e *Kingella denitrificans*. Todas utilizam carboidratos por via oxidativa e não fermentativa, sendo baixa a acidez, de modo que podem acontecer reações duvidosas com o meio CTA (Cystine Tripticase Agar) com indicador vermelho de fenol, que sempre foi muito utilizado em rotina.

As diferentes espécies de neisseria, incluindo *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, são analisadas junto com a *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., *Kingella* spp e *Alcaligenes* spp. pelas características morfológicas de serem cocos ou cocóides ao Gram e pela possibilidade de haver confusão na sua identificação.

Quanto a sua importância clínica, a maioria das neisserias é comensal vivendo em mucosas de humanos e animais.

Diagnóstico diferencial entre Neisserias e outros cocobacilos Gram negativo

Bactéria	Morfol.	OXI	CAT	OF Gli	CTA Gli	DNase	AS	MOT
<i>Neisseria meningitidis</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	+	neg
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	neg	neg
<i>Neisseria</i> spp.	diplococo/ bacilo	+	variável	variável (oxidativo)	variável	neg	+	neg
<i>Moraxella catharralis</i>	diplococo	+	+	inerte	neg	+	+	neg
<i>Kingella</i> spp.	cocobacilo	+	neg	fermentador	+	neg	+	variável
<i>Moraxella</i> spp.	cocobacilo	+	+	inerte	neg	neg	+	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	cocobacilo	neg	+	variável (oxidativo)	variável	neg	+	neg
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Cocobacilo / bacilo	+	+	inerte	neg	neg	+	+

OXI = oxidase CAT=catalase OFGli=OF Glicose CTAGli= utilização da glicose em base ágar cistina tripticase
AS = crescimento em Ágar Sangue MOT = motilidade

CARACTERÍSTICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	É sempre considerada patogênica, de transmissão sexual ou pelo parto e indicativa de tratamento. No homem causa uretrite, sendo até 50% assintomática e está relacionada a complicações como epididimite, prostatite e estenose uretral. Na mulher causa corrimento vaginal, endocervicite, uretrite, abscesso vestibular, salpingoneooforite e doença inflamatória pélvica. Pode ser isolada também na mucosa oral e anal, e em recém-nascidos pode causar uma conjuntivite denominada Oftalmia neonatorum. A doença sistêmica disseminada pode ocorrer em 1 a 3% dos pacientes infectados, principalmente em assintomáticos e caracterizada por febre, tremores, lesões cutâneas, artrite de extremidades. As lesões cutâneas são do tipo máculo-pustulares ou hemorrágicas, com centro de necrose. Raramente ocorre artrite séptica com 50% de positividade de isolamento. Pode ocorrer meningite e endocardite.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Pode causar meningite, infecção sistêmica grave com coagulação intravascular disseminada (CIVD) e elevada mortalidade, podendo causar em associação outras infecções (conjuntivite, artrite, sinusite e pneumonia). Em mucosas pode ser isolada em portadores sãos em 5 a 15 % dos indivíduos e por períodos de semanas a meses. A transmissão se faz por vias aéreas.

Moraxella
(Branhamella)
catarrhalis

Potencial patógeno de vias aéreas, principalmente em crianças e adultos jovens. Causa com maior frequência otite, sinusite e pneumonia. Mais raramente pode causar endocardite e meningite. Em idosos, após o *Haemophilus influenzae* e o Pneumococo, constitui a terceira causa de pneumonia em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Em adultos raramente é isolada em pacientes assintomáticos. Cerca de 80% das cepas são produtoras de beta-lactamase, e são detectadas através do teste do Nitrocefim (cefalosporina cromogênica). Outras espécies de *Neisseria* raramente são isoladas em casos de endocardite

ISOLAMENTO

NEISSERIA GONORRHOEAE

Material clínico para isolamento (escolha depende dos sintomas):

- Uretral
- Endocervical (sexualmente ativas/vaginal em meninas)
- Retal (colher secreção mucosa e não fezes, utilizando meio seletivo tipo Thayer Martin)
- Orofaringe
- Conjuntiva
- Glândula de Bartholin
- Trompas
- Endométrio
- Líquido sinovial
- Lesões de pele
- Sangue

Recomenda-se:

- Utilizar swab com algodão atóxico ou swab de Rayon ou Dacron.
- Semear o mais rápido possível nos meios sólidos, e usar placas aquecidas previamente em estufa.
- Urina pode ser utilizada, após centrifugação rápida e semeadura do sedimento.
- Em meio seletivo, deve-se, no entanto, preferir outros materiais com maior chance de isolamento.
- Usar frascos de hemocultura sem o anticoagulante SPS que é inibidor para as *N. Gonorrhoeae* (Ex: Caldo BHI com 1% de gelatina).
- Em lesões de pele preferir a biópsia que o swab.
- Incubar em jarra com umidade e vela.
- Sempre realizar bacterioscopia pelo Gram.

NEISSERIA MENINGITIDIS

Materiais clínicos para isolamento, de acordo com aspectos clínicos:

- LCR
- Sangue (usar frascos de hemocultura sem SPS como anti-coagulante)
- Aspirado de petéquias
- Sufusões hemorrágicas ou biópsias
- Líquido sinovial
- Swab de conjuntiva
- Aspirado traqueal, ou transtraqueal ou escarro
- Swab de nasofaringe (preferível a swab de orofaringe)

MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS

Material clínico adequado para isolamento de acordo com o quadro clínico:

Otite média	Timpanocentese (miringotomia) quando indicado. Secreção colhida com swab em geral revela flora contaminante, exceto se rompimento espontâneo muito recente e sem uso prévio de antimicrobianos.
Sinusite	Aspirado de seios da face comprometidos, quando indicado.
Infecções do trato respiratório inferior/pneumonia	Escarro, aspirado traqueal, transtraqueal podem ser úteis ou BAL, quando indicado e comparados com bacterioscopia.

TRANSPORTE E SEMEADURA DO MATERIAL

O ideal é semear imediatamente após a coleta em meio sólido, levar para a estufa 36°C em jarra com vela ou com gerador de CO₂ e umidade. O uso de meios de transporte como Stuart ou Amies deve ser considerada uma alternativa de risco. Para *M. catarrhalis*, os meios de transporte são adequados.

NEISSERIA GONORRHOEAE

- É sensível a variações de temperatura acima de 37°C ou abaixo de 35°C, de modo que a amostra não pode ser refrigerada.
- Recomenda-se ágar chocolate enriquecido com suplemento com l-cisteína, NAD e vitaminas (Isovitalex ou similar), embora seja possível obter crescimento de algumas cepas em ágar sangue.
- Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO₂ (jarra com vela ou gerador de CO₂).
- Secreção retal, swab de orofaringe, ou outros materiais com maior microbiota contaminante ou menor expectativa de isolamento, semear, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado (TMM) ou meio New York City (NYC).

NEISSERIA MENINGITIDIS

- É um pouco mais tolerante a variações de temperatura, mas recomenda-se para transporte ambientes com CO₂.
- Cresce bem em ágar sangue, mas por precaução, deve-se semear também em ágar chocolate.
- Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO₂ (jarra com vela ou gerador de CO₂).
- Materiais com maior flora contaminante ou menor expectativa de isolamento, semear, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado (TMM) ou meio New York City (NYC).
- Meios seletivos como TMM inibem crescimento de enterobactérias, a maioria das outras espécies de Neisserias (7,5 µg/ml de colistina), Gram positivos (Vancomicina 3 µg/ml) e fungos (13,5 µg/ml de nistatina); e contém suplementos para suportar crescimento das *Neisserias meningitidis* e *N. gonorrhoeae*.

MORAXELLA CATHARRALIS

- Tolerância temperatura ambiente e cresce bem em ágar sangue.
- Material estéril ou com pouca microbiota (LCR, sinovial, sangue, biópsia, conjuntiva, nasofaringe).
- Pode usar meio não seletivo

BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

- A partir das amostras genitais, LCR, biópsia, etc., deve-se sempre reservar material para a bacterioscopia, fazendo o esfregaço no momento da coleta, ou colhendo dois swabs, ou material suficiente para a semeadura e bacterioscopia.
- Quando o swab é único, no caso das Neisserias dá-se preferência à semeadura imediata e posteriormente:
 - Ressuspender o swab em 1 ml de salina;
 - Agitar no Vortex;
 - Centrifugar;
 - Fazer um esfregaço do sedimento.
- Relatar a bacterioscopia de modo a quantificar no material analisado a presença ou ausência de diplococos Gram negativos com características de neisserias em:
 - raros (+) - moderados (+++)
 - poucos (++) - muitos (++++)
- Descrever se os microrganismos são extra-celulares ou intra-celulares e quantidade de neutrófilos e de células epiteliais.

- É importante correlacionar a bacterioscopia com achados de cultura e dados do paciente, como quadro agudo, portador, etc. Em casos de abuso sexual é fundamental o isolamento e identificação completa, considerando que neisserias saprófitas ou mesmo *Acinetobacter* spp. podem ser diagnosticados erroneamente como *N. gonorrhoeae*.

IDENTIFICAÇÃO

As *N. gonorrhoeae* crescem em ágar chocolate formando colônias pequenas, sendo em geral menores que as de neisserias saprófitas. A cor pode variar de cinza a amarelo. A colônia da *M. catarrhalis* é de cor cinza róseo-acinzentado, sendo comumente friável, saindo inteira quando removida com a alça bacteriológica. As colônias de *N. meningitidis* A e C capsuladas apresentam mucóides.

Testes imunológicos não substituem a cultura e a bacterioscopia, e para o diagnóstico da gonorréia existem no comércio recursos do tipo ELISA, sondas genéticas de ácido nucléico, PCR e suas variantes, de elevado custo e indicado em levantamentos epidemiológicos, ou quando não se dispõe dos recursos tradicionais.

Para LCR e outros fluídos estéreis e mesmo urina, a caracterização de *Neisseria meningitidis* pode ser feita pela técnica de aglutinação com partículas de látex que é rápida, com boa sensibilidade, especificidade e permite a tipagem dos principais tipos prevalentes em meningites. O teste pode ser positivo nos casos de cultura negativa por uso prévio de antimicrobianos, sendo, no entanto, de custo elevado. Para o tipo B alguns produtos oferecem testes para afastar reação cruzada com *E. coli*. A reação negativa não exclui o diagnóstico que deve ser sempre avaliado juntamente com a bacterioscopia e a cultura.

BACTERIOLOGIA

A identificação de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* pode ser feita em dois níveis: presuntivo e confirmatório. Em serviços de Saúde Pública (DST) onde a prevalência da gonorréia é significativa, para fins práticos de tratamento pode-se fazer o diagnóstico utilizando-se aspectos clínicos associados à bacterioscopia positiva (Diplococos Gram negativos intra-celulares) em pacientes de risco. Deve-se, no entanto, sempre colher material para cultura, possibilitando a confirmação e monitoramento da resistência destas bactérias.

Na ocorrência de surtos de meningite meningocócica, o diagnóstico presuntivo para fins de tratamento, também pode basear-se na clínica e na bacterioscopia do LCR ou de lesões (petéquias e púrpuras). As culturas devem sempre ser colhidas para confirmação, identificação de sorotipo e sensibilidade aos antimicrobianos através dos seguintes procedimentos:

- Fazer bacterioscopia das colônias isoladas para confirmar a presença de diplococos Gram negativos com forma de dois feijões.
- Fazer o teste de oxidase das colônias sugestivas.
- Deve-se procurar afastar outros gêneros de bactérias como *Acinetobacter* spp., *Kingella* spp. e *Moraxella* spp. que são morfologicamente parecidos. Um recurso prático para evitar erros de identificação de *Acinetobacter* spp. e *Kingella* spp. como Neisserias é:
 - Semear o agente suspeito em ágar chocolate.
 - Colocar um disco de penicilina de 10 ui.
 - Após 24h fazer um gram das colônias que crescerem próximas a zona de inibição.
 - Se permanecerem cocóides com aspecto de neisserias confirma-se o isolamento; caso tenham adquirido a forma de bacilos longos, o isolado não é de Neisseria.
- Outro passo importante é verificar a capacidade de crescimento em meios pobres como o ágar nutriente ou a necessidade de crescimento em meio rico (ágar chocolate suplementado).
- A identificação das espécies de neisseria baseia-se na utilização de açúcares: glicose, maltose, lactose, sacarose e frutose. Como as neisserias utilizam carboidratos por via oxidativa, a base Ágar Cistina Tripticase (CTA) adicionada de 1% de cada um dos açúcares e com indicador vermelho de fenol tem sido utilizado. No entanto, reações duvidosas podem ocorrer, por falha na detecção da acidez produzida pela bactéria, dificultando a identificação. Recomenda-se enviar a cepa isolada rapidamente ao Laboratório de Referência para confirmação.

Provas de rotina para diferenciar Neisserias patogênicas

Bactéria	AC 22°C	A. Nut. 35°C	DNase	GLI	MAL	LAC	SAC	FRU
<i>N. gonorrhoeae</i>	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg
<i>N. meningitidis</i>	neg	v	neg	+	+	neg	neg	neg
Outras neisserias	+	+	neg	variável	variável	variável	variável	variável
<i>M. catharralis</i>	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Kingella</i> spp.	v	+	neg	+	neg	neg	neg	neg

AC = crescimento em ágar chocolate a 22°C

A. Nut. = crescimento em ágar nutriente a 35°C

GLI = glicose MAL = maltose LAC = lactose

SAC = sacarose FRU = frutose

3. ENTEROBACTÉRIAS

INTRODUÇÃO

É a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram negativas de importância médica. São considerados atualmente: 27 gêneros / 102 espécies / 08 grupos indefinidos. Independente da complexidade, mais de 95% das amostras implicadas em caso clínicos são colocadas em 25 espécies, sendo possível o isolamento de enterobactérias de qualquer amostra clínica.

CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

São bacilos Gram negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, e que crescem em meios básicos (caldo peptona), meios ricos (ágar sangue, ágar chocolate e CLED), meios seletivos (Mac Conkey, EMB). São anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose), fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos, e reduzem nitrato a nitrito.

São divididos através de diferentes provas em 11 principais gêneros, tendo sido descritos nos últimos anos outros 16 gêneros e algumas espécies, mas ainda consideradas de pouca ou nenhuma importância clínica.

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

- A maioria das enterobactérias é encontrada no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais.
- Alguns também são considerados enteropatógenos por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais como a *Salmonella typhi*, outras salmonellas, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e vários sorotipos de *Escherichia coli*, embora possam também causar infecção em outros locais.
- As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica
- São responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias.

INFECÇÕES HOSPITALARES E NA COMUNIDADE

Nas infecções hospitalares:

- As enterobactérias que atualmente predominam são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.
- Principais gêneros das enterobactérias (cerca de 99% dos isolamentos de enterobactérias de importância clínica): *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp.
- As enterobactérias menos isoladas são: *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp.
- Baseado em dados de prevalência e importância clínica, considera-se necessário que os laboratórios de microbiologia utilizem metodologia que permita discriminar com $\geq 80\%$ de acerto os gêneros e espécies considerados abaixo:

- | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| - <i>Escherichia coli</i> | - <i>Citrobacter koseri</i> | - <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| - <i>Shigella</i> spp. | - <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> |
| - <i>Salmonella typhi</i> | - <i>Klebsiella oxytoca</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> |
| - <i>Salmonella</i> spp. | - <i>Providencia</i> spp. | - <i>Enterobacter agglomerans</i> |
| - <i>Citrobacter freundii</i> | - <i>Serratia</i> spp. | - <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| - <i>Proteus mirabilis</i> | - <i>Proteus vulgaris</i> | - <i>Morganella morganii</i> |

Nas infecções da comunidade:

- Destacam-se: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.

Principais provas para a identificação das enterobactérias de importância clínica

1. Fermentação da glicose
2. Fermentação da lactose
3. Motilidade
4. Utilização de citrato
5. Descarboxilação da lisina
6. Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)
7. Produção de gás (CO₂)
8. Oxidase
9. Produção de indol
10. Produção de urease
11. Produção de fenilalanina desaminase ou opção triptofanase
12. Produção de gelatinase ou opção DNase

Provas complementares de Identificação

- Fermentação de outros carboidratos: sacarose, maltose, arabinose, salicina, dulcitol, manitol, etc.
- Utilização de aminoácidos: arginina e ornitina
- Hidrólise da esculina, etc.
- ONPG
- Utilização de acetato
- Provas úteis, mas pouco utilizadas: vermelho de metila, voges-proskauer, crescimento em KCN, tartarato de jordan e lipase.

Os esquemas de identificação baseiam-se na determinação dos gêneros e espécies mais isolados na clínica, e nas provas mais características de cada gênero e espécie, baseado em alguns critérios como: facilidade de execução, facilidade de interpretação, custo, rapidez para leitura, etc.

TIPOS DE TESTES UTILIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO

- Podem ser utilizados testes preparados no laboratório, desde que submetidos a controle de qualidade.
- Adquiridos no comércio em testes isolados ou em kits acompanhados dos respectivos esquemas de identificação.
- Métodos automatizados em geral utilizam estas mesmas provas e ampliam o número de testes podendo caracterizar com maior segurança e melhor poder de discriminação de gêneros e espécies não comuns.
- Métodos rápidos em geral utilizam substratos cromogênicos para detecção de enzimas produzidas pelas bactérias e que se revelam após 4 a 6 horas de incubação.

Na rotina bacteriológica, existem várias alternativas e, com base em conjuntos ou sistemas simplificados de provas bioquímicas, é possível realizar a triagem e identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico. Desse modo, das enterobactérias isoladas de amostras clínicas, cerca de 90%, podem ser perfeitamente identificadas através desses esquemas, podendo o resultado ser entregue dentro de um espaço de tempo relativamente curto, geralmente, entre 48 a 72 horas.

MEIO IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ)

Este meio foi elaborado para triagem de enterobactérias e consiste de 9 provas em apenas um tubo de ensaio, que consistem em: indol (tampa), fermentação da sacarose e glicose e produção de gás, fenilalanina, uréia, H₂S, Lisina, Motilidade.

Baseado nestas provas é possível identificar as seguintes bactérias:

- | | | |
|--|--|--|
| - <i>E. coli</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> | - <i>Salmonella typhi</i> |
| - <i>Shigella</i> (indol positiva) | - <i>Providencia</i> spp. (uréia positiva) ou <i>Morganella morganii</i> | - <i>Citrobacter freundii</i> |
| - <i>Shigella</i> (indol negativa) | - <i>Providencia</i> spp. (uréia negativa) | - <i>Serratia marcescens</i> (provas complementares) |
| - <i>Enterobacter aerogenes</i> | - <i>Proteus mirabilis</i> | - <i>Vibrio cholerae</i> |
| - <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - <i>Proteus vulgaris</i> | - <i>Vibrio</i> spp. |
| - <i>Klebsiella</i> spp. (sacarose negativa) | - <i>Salmonella</i> spp. | - bactérias não fermentadoras |

Vantagens e limitações

O meio IAL tem a vantagem de ser prático para inoculação e de baixo custo. Sua desvantagem é a dificuldade de interpretação de tantas provas, exigindo muita experiência prévia com o meio. Este meio identifica os principais gêneros de enterobactérias, indicando a presença de bactérias não fermentadoras e *Vibrios*.

Para caracterizar corretamente as espécies de *Enterobacter*, gênero *Serratia*, gênero e espécies de *Pseudomonas* há necessidade de realizar provas complementares.

Pelas limitações do poder discriminatório de gêneros e espécies de enterobactérias não se recomenda este meio, como única opção, na identificação de bactérias envolvidas em infecções hospitalares. Uma alternativa seria utilizar os resultados obtidos do meio IAL como triagem e adicionar os testes complementares, como Citrato e a fermentação da lactose verificada no crescimento em ágar Mac Conkey.

Variantes do meio IAL

Tubo 1 – meio de Rugai sem sacarose provas: fenilalanina, fermentação da glicose, gás, H₂S, uréia

Tubo 2 – MIO (Motilidade Indol Ornitina)

Tubo 3 – lisina

Tubo 4 – citrato

Tubo 5 – rhamnose

CONJUNTO EPM / MiLI / CITRATO

Trata-se praticamente da mesma combinação de reações do meio IAL ou Rugai & Araújo (modificado por Pessoa & Silva), separados em 2 tubos, passando a verificação do indol da tampa do IAL, para o meio MILi após adição do reativo de Kovacs.

Tubo EPM	<ul style="list-style-type: none">- inocular picando até o fundo- semear na superfície- incubar com a tampa frouxa 24hs/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ Fermentação da glicose, produção de gás, H₂S, uréia, fenilalanina.
Tubo MILI	<ul style="list-style-type: none">- fazer picada central apenas- incubar 24hs/35°C- adicionar 3 gotas de reativo de Kovacs após a leitura da lisina para o teste de indol<ul style="list-style-type: none">▪ Motilidade: as imóveis crescem apenas na linha de picada.▪ Descarboxilação da lisina: lisina positiva o meio torna-se roxo, na prova negativa o meio permanece amarelado nos 2/3 inferiores.▪ Indol: a formação de um anel rosa na superfície do meio indica positividade para o indol.
Citrato	<ul style="list-style-type: none">- inocular a superfície- incubar 24hs/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ A prova positiva é evidenciada pelo aparecimento de coloração azul na superfície.

Interpretação do Meio EPM

Base	Produção de gás	Formação de bolhas ou rachaduras no meio
	Produção de H ₂ S	Presença de pigmento negro de qualquer intensidade
	Hidrólise da Uréia	Coloração azul esverdeada (fraca) na base indica prova positiva
Superfície	Desaminação do Triptofano	Reação positiva – verde escuro ou acastanhado Reação negativa – superfície inalterada

MEIO TRÍPLICE AÇUCAR FERRO (TSI)

Considerado o mais clássico dos sistemas de identificação, necessita de provas adicionais, mas tem a vantagem de ser de mais fácil interpretação. Abaixo será descrito em detalhes e será a base da identificação de enterobactérias.

Acurácia da identificação - qualquer sistema de testes existentes no comércio, com leitura manual ou automatizada, tem limitações no número de provas e de discriminação dos diferentes gêneros e espécies de enterobactérias, de modo que a maioria dos esquemas trabalha com um máximo de 80% de acerto. Os esquemas de identificação de enterobactérias podem utilizar uma ampla gama de recursos, variando desde nove reações como meio IAL ou Rugai & Araújo modificado por Pessoa & Silva, até dez testes propostos neste manual, ou sistemas como API 32E que pode identificar enterobactérias e alguns não fermentadores, utilizando 32 testes. É importante destacar que nenhum sistema oferece 100% de acerto para a caracterização das espécies de enterobactérias, mas analisam o principal comportamento descrito na literatura.

A fonte de informação mais utilizada baseia-se na tabela organizada por Farmer (1991) contando com 47 provas, e os respectivos percentuais de positividade para 28 diferentes gêneros e 121 espécies de enterobactérias. Os principais gêneros e espécies de importância clínica podem ser caracterizados com >95% de acerto com poucas provas. Entretanto para as espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* os testes mais utilizados apresentam baixo poder de discriminação, sendo a identificação feita pelo maior percentual de probabilidade.

É necessário destacar que padrões não usuais podem ocorrer e que o microbiologista deve estar atento para analisar cepas que possam ter importância clínica e epidemiológica ou encaminhá-las a Laboratórios de Referência. Antes, no entanto, deve certificar-se que a análise não esta sendo feita com cultura mista de bactérias.

O meio de TSI é inclinado em bico de flauta, de cor vermelho-cereja e deve ser inoculado por picada central até o fundo, seguido de espalhamento na superfície e incubação durante 18-24h a 35°C.

Provas do Meio de TSI

a) Púrpura/amarelo (ápice púrpuro e base amarela)	=	fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativas)
b) Amarelo/amarelo (ápice e base amarelos)	=	fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares)
c) Presença de gás (CO ₂)	=	bolhas ou meio fragmentado
d) H ₂ S positivo	=	presença de precipitado negro

Interpretação do resultado das reações encontradas no TSI

Ápice	Base	H ₂ S	Gás	Interpretação mais provável
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Sem crescimento = bactéria exigente
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Não Fermentador ou Gram (+)
Amarelo	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Gram (+)
Vermelho	Amarelo	neg	variável	Enterobactéria ou <i>Aeromonas</i> lactose e sacarose negativas
Amarelo	Amarelo	neg	variável	Enterobactéria
Amarelo	Amarelo	+	variável	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus/Morganella/Providencia</i> e <i>Citrobacter</i>

Obs. A presença de H₂S em bactérias lactose e sacarose negativas pode ser menos evidente, pois a precipitação de sais de ferro pelo sulfeto de hidrogênio depende de meio ácido (Ex: *Salmonella typhi*)

ETAPAS DA IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

ANÁLISE DO CRESCIMENTO NOS MEIOS RICOS E SELETIVOS

A identificação de uma enterobactéria começa com a análise do material semeado. Em geral temos os seguintes meios para interpretar:

- Secreções: ágar sangue e Mac Conkey
- Líquidos nobres e biópsias: Ágar Chocolate e Mac Conkey
- Fezes: Mac Conkey e Salmonella-Shigella
- Urina: CLED ou ágar sangue e Mac Conkey, etc.

Devemos considerar que:

- A enterobactéria sempre cresce nos meios ricos (ágar sangue, chocolate e CLED), bem como nos meios seletivos: ágar Mac Conkey e Salmonella-Shigella.
- Os Gram positivos como regra não crescem em ágar Mac Conkey e Salmonella-Shigella, exceto os enterococos que podem crescer.
- No ágar Mac Conkey e Salmonella-Shigella, além das enterobactérias e dos enterococos, podem crescer bactérias não fermentadoras e *Candida*.

Portanto caracteriza-se uma enterobactéria quando ela esta presente em todos os meios semeados, mas ainda é necessário diferenciar de outros microrganismos não muito exigentes como não fermentadores, enterococos e *Candida* spp.

Recomenda-se realizar:

- Gram da colônia isolada – sempre fazer o Gram para evitar enganos de interpretação (diferenciar cocos de bacilos, Gram positivos de Gram negativos e leveduras).
- Prova da oxidase – indicada para detectar e/ou diferenciar o grupo *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* que também são fermentadores.
- Prova do metabolismo fermentador – triagem utilizando os meios de OF glicose (quando suspeitar de não fermentador), TSI (Triplíce Açúcar Ferro) ou EPM (Rugai sem sacarose), para enterobactérias.
- Série bioquímica complementar – sempre necessária para caracterizar gênero e espécie. O número de provas vai permitir maior ou menor discriminação (vide a seguir o nível de complexidade de provas).

As Enterobactérias caracterizam-se por se apresentarem como: bacilos Gram negativos, fermentadores da glicose, com ou sem produção de gás, oxidase negativas, reduzem nitrato a nitrito e que crescem bem no meio de Mc Conkey ou EMB.

Como modelo de triagem na identificação bacteriana tem sido utilizado o meio de TSI (Triplíce Açúcar Ferro), que permite avaliar a fermentação da glicose, produção de gás, fermentação de lactose e/ou sacarose e produção de H₂S.

O TSI constitui o meio de identificação preliminar mais utilizado no mundo, sendo necessário, no entanto, necessário adicionar algumas provas, para completar a identificação e classificadas em dois níveis de complexidade:

Nível de complexidade 1	motilidade, indol, lisina, uréia, citrato, lactose (Mac Conkey), fenilalanina, DNase e oxidase.
Nível de complexidade 2	provas do nível 1 e ornitina, arginina, sacarose, arabinose, malonato, esculina e PYR.

DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS PROVAS BIOQUÍMICAS

Motilidade, H₂S e Indol	<ul style="list-style-type: none">- Semear por picada até o fundo, e incubar 24h/35°C- Após 24h de incubação, pingar 3-4 gotas de Kovacs na superfície do meio- Meios Motilidade/indol com resazurina (motilidade); SIM (motilidade, indol e H₂S) e Mili (Motilidade, Indol e Lisina)<ul style="list-style-type: none">▪ crescimento apenas na linha de picada = motilidade negativa▪ crescimento difuso em todo o meio = motilidade positiva▪ H₂S positivo = meio enegrecido▪ H₂S negativo = cor inalterada do meio Indol▪ cor púrpura = indol positivo▪ cor do reagente = indol negativo
Uréia de Christensen	<ul style="list-style-type: none">- Inocular apenas na superfície e incubar 24h/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ Urease positivo = cor vermelha (<i>Proteus</i>: reação mais intensa)▪ Urease negativo = mantém cor amarelada do meio
Citrato de Simmons	<ul style="list-style-type: none">- Inocular na superfície e incubar 24h/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ Citrato positivo = azul e/ou crescimento no meio▪ Citrato negativo = cor verde (inalterado)
Fenilalanina	<ul style="list-style-type: none">- Inocular a superfície do meio (inclinado) e incubar 24h/35°C- Após crescimento pingar na superfície 5 gotas do reagente cloreto férrico a 10%<ul style="list-style-type: none">▪ FA positivo = cor verde escuro na superfície▪ FA negativo = mantém a cor do meio inalterada

IDENTIFICAÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

CONSIDERAÇÕES

- Valores positivos ou negativos referem-se a 80% ou mais de definição; para saber o real percentual de provas positivas ou negativas consultar a tabela geral.
- PB (padrão bioquímico) = probabilidade teórica da bactéria em questão; apresentar o padrão bioquímico analisado (os testes considerados são indicados pelo sinal #).
- Exemplo: PB para *Proteus vulgaris* em relação às provas, H₂S +(98%) FA +(95%) Indol + (98%) (multiplicar os percentuais de ocorrência)= 92%.
- PB baixo significa ter outro padrão mais frequente.
- Os padrões bioquímicos pouco frequentes terão menor probabilidade de isolamento.
- Não é aplicado quando se considera gênero, pois envolve várias espécies com diferentes padrões de testes (ex: *Salmonella* spp.).
- Valores seguidos do sinal positivo (+) ou negativo (neg) significa o percentual de cepas com resultado do teste positivo ou negativo. Ex: Lisina 75%+ = 75% das cepas são lisina positiva.
- V = valores >20% e <80% de reações positivas ou negativas; estas provas podem ser úteis para diferenciar duas espécies ou dois gêneros quando a reação só ocorre para uma delas. Ex.: uréia em relação a *E. coli* e *Citrobacter*. *E. coli* é negativa e *Citrobacter* variável. Se a reação encontrada for positiva, exclui-se *E. coli*.
- Pela importância clínica e epidemiológica, padrões não comuns de *Yersinia* e *Salmonella* spp. foram considerados, pois na prática a motilidade pode ser duvidosa e o H₂S pode ser falso-negativo.
- As provas destacadas com fundo cinza têm a finalidade de facilitar a busca de provas-chave na diferenciação bacteriana.
- Recomenda-se de rotina utilizar as provas do nível 1 que, para a maioria das bactérias da rotina, permite uma caracterização adequada. Quando houver necessidade usar as de nível 2.

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA SIMPLIFICADA DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS - NÍVEL DE COMPLEXIDADE 1

H₂S (gás sulfídrico) positivo, FA (fenilalanina) positivo

	Bactérias	PB#
Indol +	<i>Proteus vulgaris</i>	92%
Indol neg	<i>Proteus mirabilis</i>	94%

H₂S negativo , FA positivo

	Bactérias	Citrato	Uréia	PB#
Indol +	<i>Providencia</i> spp.	+	variável	88%
	<i>Morganella morganii</i>	neg	+	72%
Indol neg	<i>P. penneri</i>	neg	+	69%
	<i>Enterobacter</i> spp.	variável	neg	<16%

H₂S positivo, FA negativo, Indol positivo

Bactérias	Citrato	Motilidade	Urease	Lisina	Lac MC	PB#
<i>Citrobacter freundii</i>	78%+	89%+	variável	neg	+	25%
<i>Edwardsiella tarda</i>	neg	+	neg	+	neg	99%

Lac MC = lactose em Mac Conkey

H₂S positivo, FA negativo, Indol negativo

Bactérias	Urease	Citrato	Lisina	Motilidade	Gás	Sorotipagem	PB#
<i>Salmonella</i> spp.	neg	+	+	+	+	+	
<i>S. typhi</i>	neg	neg	+	+	neg	+	97%
<i>S. gallinarum</i> / <i>S. pullorum</i>	neg	neg	+	neg	variável	+	90%
<i>C. freundii</i>	variável	+	neg	+	+	neg	52%

H₂S negativo , FA negativo , Indol positivo, motilidade negativa

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Latose	Gás	Sorotipagem	PB#
<i>Y. enterocolitica</i> ¹	neg	75%+	neg	neg	neg	+ Yersinia	50%
<i>Shigella</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	+ Shigella	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	+	não	99%
<i>E.coli</i> inativa (rara)	neg	neg	variável	75% neg	neg	Invasora ²	80%

¹ - positivo à temperatura ambiente e negativa à 37°C

² - em coprocultura testar p/ *E. coli* invasora

H₂S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade positiva

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Lactose	Gás	PB#
<i>E. coli</i>	neg	neg	+	+	+	97%
<i>Citrobacter</i> spp.	+	variável	neg	variável	+	
<i>Aeromonas</i> spp. ¹	variável	neg	+	neg ²	variável	

¹ - oxidase positiva (verificar *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*)

Aeromonas Dnase positiva e *Plesiomonas* Dnase negativa

² - *Aeromonas caviae*: lisina negativa e lactose positiva

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Bactérias	Urease	Citrato	Lisina	Gás	Lactose	Comentário	PB#
<i>Shigella</i> spp. (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	+	+	+	+	+	Colônia mucóide	100%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	75%+	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>E. agglomerans</i> ³	neg	variável	neg	neg	variável	15% mot neg	9,6%

¹ - cepas isoladas do trato respiratório superior, especialmente nariz podem ser uréia negativas e bioquimicamente pouco ativas (citrato variável, lisina variável), denominadas *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*

² - motilidade positiva à temperatura ambiente

³ - pode ocorrer falsa motilidade negativa em meio semi-sólido e positiva em caldo

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato negativo

Bactérias	Lisina	Lactose	Sorotipagem	PB#
<i>Hafnia alvei</i>	+	neg	negativa	76%
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	neg	+	37%
<i>Salmonella paratyphi A</i>	neg	neg	+	90%
<i>E. agglomerans</i>	neg	variável	negativa	25%

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo, DNase e gelatinase negativas

Bactérias	Lisina	Urease	Lactose	Gás	Sorotipagem	PB#
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	neg	+	++	neg	95%
<i>Enterobacter cloacae</i>	neg	v	+	++	neg	95%
<i>Salmonella typhi</i>	+	neg	neg	neg	+	12%

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo, DNase e gelatinase positivas, *Serratia* spp.

Bactérias	Lisina	Urease	Lactose	Gás	Pigmento vermelho	PB#
<i>Serratia marcescens</i>	+	85% neg	neg	55% +	variável	95%
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	neg	90% neg	75% pos	neg	76%
<i>Serratia rubidae</i> ¹	55% +	neg	+	70% neg	variável	85%

¹ - raramente isolada

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA SIMPLIFICADA DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS - NÍVEL DE COMPLEXIDADE 2

H₂S positivo, FA positivo

	Bactérias	Ornitina	Sacarose	PB#
Indol positivos	<i>Proteus vulgaris</i>	neg	+	92%
	<i>Morganella morganii</i>	+	neg	20%

	Bactérias	Ornitina	Citrato	PB#
Indol negativos	<i>Proteus mirabilis</i>	+	variável (65%+)	94%
	<i>Proteus penneri</i>	neg	neg	30%

H₂S negativo, FA positivo

	Bactérias	Urease	Citrato	Sacarose	Ornitina
Indol negativos	<i>Proteus penneri</i>	+	neg	+	neg
	<i>Morganella morganii</i>	+	neg	neg	+
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	neg	+	75%+	neg
	<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	+	+	+

	Bactérias	Citrato
Indol positivos	<i>Morganella morganii</i>	neg
	<i>Providencia</i> spp.	+

H₂S positivo, FA negativo, Indol positivo

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Ornitina	Lactose	Sacarose
<i>Citrobacter freundii</i>	78%+	44%+	neg	neg	78%+	89%+
<i>Edwarsiella tarda</i>	neg	neg	+	+	neg	neg

H₂S positivo, FA negativo, Indol negativo

Bactérias	Uréia	Citrato	Lisina	Ornitina	Motibil.	Arabinos	Gás	Sorotip.
<i>Salmonella</i> spp.	neg	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	neg	neg	+	neg	+	neg	neg	+
<i>S. choleraesuis</i>	neg	25%+	+	+	+	neg	+	+
<i>S. paratyphi A</i>	neg	neg	neg	+	+	+	+	+
<i>S. gallinarum</i>	neg	neg	+	neg	neg	+	neg	+
<i>S. pullorum</i>	neg	neg	+	+	neg	+	+	+
Outras Salmonellas	neg	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	44%+	78%+	neg	neg	89%+	+	89%+	neg

Triagem rápida para principais bactérias H₂S positivas

Bactérias	PYR	Fenilalanina
<i>Salmonella</i> spp.	neg	neg
<i>Citrobacter</i> spp.	+	neg
<i>Proteus</i> spp.	neg	+

H₂S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade negativa

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Ornitina	Lactose	Gás	Sorotip.	PB#
<i>Y. enterocolitica</i> ¹	neg	75%+	neg	+	neg	neg	+	50%
<i>Shigella</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	+	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	neg	+	++	NI	99%
<i>E. coli inativa (rara)</i>	neg	neg	40%+	20%+	25%+	neg	invasora ²	80%

¹- positiva à temperatura ambiente e negativa a 37°C

²- em coprocultura testar para *E. coli* invasora

H₂S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade positiva

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Ornitina	Lactose	Gás	PB#
<i>E. coli</i>	neg	neg	90%+	65%+	+	+	97%
<i>C. diversus (koseri)</i> ¹	+	75%+	neg	+	50%+	+	97%
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ¹	+	85%+	neg	+	35%+	+	97%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	neg	75%+	neg	+	neg	neg	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	50%+	20%+	neg	neg	40%+	20%+	16%
<i>Aeromonas</i> spp. ³	variável	neg	+ ⁴	+	neg	variável	

¹ - *C. koseri* = malonato positivo *C. amalonaticus* = malonato negativo

² - motilidade negativa a 35°C e positiva à temperatura ambiente

³ - oxidase positiva: *Aeromonas* é Dnase positiva e *Plesiomonas shigelloides* é Dnase negativa

⁴ - *Aeromonas caviae* é lisina negativa e lactose positiva

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Bactérias	Urease	Citrato	Lisina	Gás	Lactose	Comentário	PB#
<i>Shigella</i> spp. (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	Sorotipagem +	>50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	Colônia Mucóide	100%
<i>Klebsiella</i> spp. ¹	neg	variável	variável	variável	variável	Mucóide	
<i>Citrobacter freundii</i>	v	78%+	neg	+	78%+	11% motil. neg	16%
<i>Yersinia enterocolítica</i> ²	75%+	neg	neg	neg	neg	Sorotipagem +	50%
<i>E. agglomerans</i> ³	neg	variável	neg	neg	variável	15% motil. neg	9,6%

¹- cepas isoladas do trato respiratório superior, especialmente nariz podem ser uréia negativas e bioquimicamente pouco ativas (citrato v, lisina v), denominadas *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*

²- motilidade + à temperatura ambiente

³- pode ocorrer falsa motilidade (negativa em meio semi-sólido e positiva em caldo)

H₂S negativo, FA negativa, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato negativo

Bactérias	Lisina	Ornitina	Lactose	Urease	Arabinos	Sorologia	PB#
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	neg	neg	+	neg	76%
<i>Salmonella typhi</i> ¹	+	neg	neg	neg	neg	+	
<i>Y. enterocolítica</i> ²	neg	+	neg	75%+	+	+	
<i>S. choleraesuis</i>	+	+	neg	neg	neg	+	
<i>S. paratyphi A</i>	neg	+	neg	neg	+	+	
<i>E. agglomerans</i>	neg	neg	40%+	20%+	+	neg	25%

¹- H₂S pode ser positivo no TSI com 48h

²- motilidade negativa à 35°C e positiva a 25°C

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa, Citrato positivo, DNase e gelatina negativas

Bactérias	Uréia	Fenil.	Lisina	Argin.	Ornit.	Malon.	Gás	Lactose	Escul.
<i>C. freundii</i>	44%+	0	0	67%+	0	11%+	89%+	78%+	0
<i>E. aerogenes</i>	2%+	0	98%+	0	98%+	95%+	100%+	95%+	98%+
<i>E. cloacae</i>	65%+	0	0	97%+	96%+	75%+	100%+	93%+	30%+
<i>E. agglomerans</i>	20%+	20%+	0	0	0	65%+	20%+	40%+	60%+
<i>E. gergoviae</i>	93%+	0	90%+	0	100%+	96%+	98%+	55%+	97%+
<i>E. sakazakii</i>	1%+	50%+	0	99%+	91%+	18%+	98%+	99%+	100%+

Versão simplificada para interpretação das provas da Lisina negativa

	Bactérias	Gás	Esculina	Arginina
Ornitina negativa	<i>Citrobacter freundii</i>	+	neg	variável
	<i>E. agglomerans</i>	neg	variável	neg

	Bactérias	Urease	Fenil.	Malonato	Esculina	Obs.
Ornitina positiva	<i>Enterobacter cloacae</i>	65%+	neg	75% +	30% +	+ comum
	<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	50%+	18% +	+	raro

Versão simplificada para interpretação das provas da Lisina positiva

Bactérias	Urease	Lactose
<i>E. aerogenes</i>	neg	+
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	variável

H₂S negativo, FA negativa, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo, Dnase e Gelatina positivas

Bactérias	Lisina	Ornitina	L-arabinose	Malonato	Motibilidade	Lactose
<i>Serratia marcescens</i>	99% +	99% +	neg	neg	+	neg
<i>S. marcescens biog</i> ¹	55% +	65% +	neg	neg	neg	neg
<i>Serratia liquefaciens</i>	95% +	95% +	+	neg	+	neg
<i>Serratia rubidae</i>	55% +	neg	+	+	+	+

CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA (%)

Bactérias	Indol	Citr.	H ₂ S	Uréia	Fenil.	Lisina	Argin.	Ornit.	Motil.
<i>Citrobacter freundii</i>	33	78	78	44	0	0	67	0	89
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	99	99	0	75	0	0	80	99	95
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	100	95	5	85	0	0	85	95	95
<i>Edwardsiella tarda</i>	99	1	100	0	0	100	0	100	98
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	0	2	0	98	0	98	97
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	100	0	65	0	0	97	96	95
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	0	20	20	0	0	0	85
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	99	0	93	0	90	0	100	90
<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	99	0	1	50	0	99	91	96
<i>Escherichia coli</i>	98	1	1	1	0	90	17	65	95
<i>Escherichia coli inativa</i>	80	1	1	1	0	40	3	20	5

<i>Shigella dysenteriae</i>	45	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	50	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Shigella boydii</i>	25	0	0	0	0	0	18	2	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	2	98	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	10	0	4	0	100	6	98	85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	98	0	95	0	98	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	95	0	90	1	99	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	30	0	10	0	40	6	3	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	95	0	20	95	95	v	0	95	v
<i>Proteus mirabilis</i>	2	65	98	98	98	0	0	99	95
<i>Proteus vulgaris</i>	98	15	95	95	99	0	0	0	95
<i>Proteus penneri</i>	0	0	30	100	99	0	0	0	85
<i>Providencia rettgeri</i>	99	95	0	98	98	0	0	0	94
<i>Providencia stuartii</i>	98	93	0	30	95	0	0	0	85
<i>Providencia alcalifaciens</i>	99	98	0	0	98	0	0	0	96
<i>Salmonella spp.</i>	1	95	95	1	0	98	70	97	95
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	97	0	0	98	3	0	97
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	25	50	0	0	95	55	100	95
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	10	0	0	0	15	95	95
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	100	0	0	90	10	1	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	100	10	95	0
<i>Salmonella outas</i>	1	90	100	0	0	99	70	99	99
<i>Serratia marcescens</i>	1	98	0	15	0	99	0	99	97
<i>Serratia marcescens bio</i>	0	30	0	0	0	55	4	65	17
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	90	0	3	0	95	0	95	95
<i>Serratia rubidae</i>	0	95	0	2	0	55	0	0	85
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	0	0	75	0	0	0	95	2

CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA (%)

Bactérias	Gelatina	Malon.	Gás glicose	Lactose	Sacarose	Escul.	DNAase
<i>Citrobacter freundii</i>	0	11	89	78	89	0	0
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	0	95	98	50	40	1	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	1	97	35	9	5	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	100	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	100	95	100	98	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	75	100	93	97	30	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	65	20	40	75	60	0

<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	96	98	55	98	97	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0	18	98	99	100	100	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	95	95	50	35	0
<i>Escherichia coli inativa</i>	0	0	5	25	15	5	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	0	0	3	1	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	2	1	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	50	98	5	10	7	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	93	97	98	99	99	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	98	97	100	100	100	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	3	50	30	20	80	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	95	0	0	75	30	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	0	1	90	1	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	90	2	96	2	15	0	50
<i>Proteus vulgaris</i>	91	0	85	2	97	50	80
<i>Proteus penneri</i>	50	0	45	1	100	0	40
<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	10	5	15	35	0
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	2	50	0	10
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0	85	0	15	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	96	1	1	5	2
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella cholerasuis</i>	0	0	95	0	0	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	99	0	0	0	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	10
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	0	0
<i>Salmonella outas</i>	1	V	100	V	1	0 ou 15	1
<i>Serratia marcescens</i>	90	3	55	2	99	95	98
<i>Serratia marcescens bio</i>	30	0	0	4	100	96	82
<i>Serratia liquefaciens</i>	90	2	75	10	98	97	85
<i>Serratia rubidae</i>	90	94	30	100	99	94	99
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	5	5	95	25	5

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, encontram-se conjuntos de amostras bacterianas bioquimicamente homogêneas e, sorologicamente relacionadas, que constituem os gêneros e, segundo alguns critérios, podem se dividir em espécies.

As amostras relacionadas bioquimicamente são divididas em subgrupos ou tipos, por critério sorológico, de acordo com a presença dos antígenos: somático (**O**), flagelar (**H**) e de envoltório ou

cápsula (**K**). Desse modo, os sorotipos são divisões baseadas no relacionamento antigênico, enquanto os biotipos são amostras do mesmo sorotipo que diferem em características bioquímicas.

Em atividades de rotina de Bacteriologia Clínica, a identificação ou confirmação sorológica é feita apenas com germes comprovadamente patogênicos e de importância epidemiológica como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* *Yersinia enterocolitica* e mesmo assim utilizando-se esquemas simplificados, através do seguinte procedimento técnico:

- Preparar uma suspensão bastante densa (aspecto leitoso), da bactéria a ser testada, utilizando solução salina a 0,85%. A massa bacteriana é proveniente do Ágar TSI usado na identificação bioquímica ou, de preferência, em ágar nutriente inclinado após repique para obtenção de massa de germes.
 - Colocar a salina sobre o crescimento bacteriano ocorrido na superfície inclinada do meio;
 - Agitar o tubo após alguns minutos de modo a obter a suspensão bacteriana;
 - Bactérias em fase rugosa tendem a se auto-aglutinar, e não devem ser utilizadas na classificação sorológica.
- Sobre uma lâmina limpa misturar uma gota do anti-soro conhecido e da suspensão bacteriana a ser testada, e, com movimentos circulares, tornar a mistura bastante homogênea continuando o movimento durante um ou no máximo dois minutos. O aparecimento de aglutinação, nesse intervalo de tempo, indica positividade da reação.
- Algumas vezes, é necessário o aquecimento da suspensão bacteriana em banho-maria fervente, durante 15 minutos, com finalidade de eliminar estruturas mais externas da célula que têm ação interferente na reação. Após o resfriamento da suspensão, repetir o teste. Caso ocorra a aglutinação, confirmar a prova.

IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA*

No gênero *Salmonella* existe uma grande quantidade de sorotipos, que não são mais considerados como espécies, e sua identificação sorológica completa e detalhada é uma tarefa restrita aos denominados Laboratórios de Referência. Para identificação rotineira no laboratório clínico utilizam-se basicamente três antisoros:

- a) Anti-*Salmonella* polivalente somático (**Grupos A,B,C,D,E**)
- b) Anti-*Salmonella* somático, Grupo D (***S. typhi***)
- c) Anti-*Salmonella*, anti **Vi**

Quando o denominado antígeno de virulência (Vi) está presente, poderá bloquear a aglutinação do antígeno somático do grupo D (*Salmonella typhi*). Desse modo, a suspensão deverá ser aquecida em banho-maria fervente e testada novamente com os três anti-soros citados, dando o resultado abaixo no caso de *Salmonella typhi*. A partir de uma reação positiva feita apenas com o antígeno somático polivalente, existe condição de confirmar a amostra como sendo do gênero *Salmonella*, sem especificar o sorotipo ou sorovar.

Antisoros	Antígeno vivo	Antígeno aquecido
Anti-soro poli somático	+	+
Grupo D somático	neg	+
Anti Vi	+	neg

Após a identificação bioquímica e aglutinação com soro polivalente, as amostras poderão ser testadas com os soros A,B,C,D,E monovalentes. A bactéria pertencerá ao sorogrupo em cujo soro houver aglutinação. Se a reação for negativa deve-se aquecer a metade da suspensão em banho-maria fervente e repetir o teste. A metade não aquecida deverá ser utilizada para determinação de antígenos flagelares. A identificação até sorotipos poderá ser feita com auxílio dos soros flagelares (a,b,c,d,i,1,2,5), e através de sua utilização é possível identificar as seguintes amostras:

Grupo Sorológico	Espécie Bacteriana
Grupo O2 (A)	<i>Salmonella paratyphi A</i>
Grupo O4 (B)	<i>Salmonella paratyphi B</i> e <i>S. typhimurium</i>
Grupo O7 (C1)	<i>Salmonella paratyphi C</i> e <i>S. cholerae suis</i>
Grupo O5 (D1)	<i>Salmonella typhi</i>

IDENTIFICAÇÃO DE SHIGELLA

O gênero *Shigella* está constituído de apenas quatro sorogrupos, que são identificados sorologicamente, de maneira simplificada, com a utilização de anti-soros polivalentes. Excepcionalmente, utiliza-se apenas o antisoro monovalente de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (bacilo de Shiga), por ser o mais patogênico.

Grupo Sorológico	Espécie Bacteriana	Sorotipos
Grupo A	<i>Shigella dysenteriae</i>	13 sorotipos
Grupo B	<i>Shigella flexneri</i>	06 sorotipos
Grupo C	<i>Shigella boydii</i>	18 sorotipos
Grupo D	<i>Shigella sonnei</i>	01 sorotipo

As culturas suspeitas deverão ser testadas primeiramente com os soros contra *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, que representam mais de 95% das amostras de *Shigella* isoladas em nosso meio. Caso não haja aglutinação, prosseguir com os outros soros.

Não ocorrendo aglutinação, é possível que a cultura seja rica em antígenos de superfície que geralmente impedem o contato do soro com o antígeno somático **O**. Estes antígenos devem ser destruídos pelo aquecimento da suspensão bacteriana por 15 minutos em banho-maria fervente, procedimento que pode ser adotado como de rotina na sorologia desse gênero.

IDENTIFICAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI

As amostras de *Escherichia coli* que causam diarreia pertencem a três grupos principais:

- Enteropatogênicas (**EPEC**)
- Enterotoxigênicas (**ETEC**)
- Enteroinvasoras (**EIEC**)

Não existe nenhuma prova bioquímica que possa, seguramente, distingui-las entre si ou de outros tipos de *E. coli* pertencentes à flora normal do intestino. As amostras EPEC e EIEC são identificadas por provas de sorotipificação rotineira, enquanto as amostras ETEC são identificadas apenas mediante provas especiais de produção de toxinas, realizadas somente em laboratórios de referência ou de pesquisa.

Soro Anti *E. coli* Enteropatogênica Clássica (EPEC)

Polivalente A	anti 026, 055, 0111, 0119
Polivalente B	anti 0114, 0125, 0142, 0158
Polivalente C	anti 086, 0126, 0127, 0128

A sorotipificação pode ser feita, utilizando-se a mesma técnica descrita para outras enterobactérias. Um melhor resultado é obtido, repicando cerca de cinco colônias características a partir do Ágar BEM ou Mac Conkey, para um tubo contendo Ágar Nutriente Inclinado, com finalidade de obter massa de

germes. É feita então uma suspensão bacteriana em solução salina, a qual será testada utilizando anti-soros polivalentes, abrangendo os sorotipos mais prevalentes na população.

Soro Anti E. coli Enteroinvasora (EIEC)

Polivalente A	anti 028ac, 029, 0136, 0144, 0152
Polivalente B	anti 0112ac, 0124, 0143, 0164, 0167

Soro Anti E. coli O 157 (EHEC)

Utilizar o soro para O157:H7

Observações importantes:

- Bactérias isoladas com o mesmo padrão de provas de materiais nobres em surtos de infecção hospitalar, ou isoladas de infecções da comunidade que possam suspeitar de um surto, ou pela gravidade da doença, ou por um padrão não esperado de resistência, devem ser remetidas ao Laboratório de Referência (LACEN/Adolfo Lutz) para melhor caracterização.
- Bactérias que não se enquadram nos padrões definidos acima, recorrer a testes suplementares ou usar kits com maior número de provas ou em caso de importância clínica (descritos acima) enviar ao Laboratório de Referência.

4. BASTONETES NÃO FERMENTADORES

INTRODUÇÃO

Os bacilos Gram negativos classificados como não fermentadores (BNFs) são microrganismos aeróbios, não esporulados, que se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de fermentação, degradando-os pela via oxidativa.

A identificação dos BNFs sempre foi um desafio para os laboratórios de rotina em microbiologia, considerando que a maioria deles não realiza este tipo de identificação, ou o faz de maneira elementar em virtude da pouca incidência em amostras ambulatoriais, assim como pela complexidade e elevado custo dos esquemas completos de identificação.

A caracterização deste grupo de bactérias é de grande importância nos casos de infecção hospitalar. Embora a sua incidência, mesmo em hospitais, seja pequena quando comparada a outros agentes etiológicos, geralmente eles apresentam resistência elevada a vários antibióticos e são capazes de causar infecções graves. Estas bactérias colonizam e causam infecções, em especial, em pacientes graves oriundos de CTI e submetidos à procedimentos invasivos, sendo importante classificá-los até o nível de gênero e espécie.

O número de bactérias não fermentadoras conhecidas é muito grande. Foram selecionadas aquelas consideradas na atualidade de maior importância clínica (*) e as demais para diagnóstico diferencial entre si.

BNFs de importância clínica consideradas neste capítulo*:

- *Acinetobacter* spp.*
- *Achromobacter* spp.
- *Burkholderia cepacia* *
- *Methylobacterium* spp.
- *Pseudomonas aeruginosa* *
- *Pseudomonas luteola*
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas pseudomallei* *
- *Stenotrophomonas* spp.*
- *Sphingobacterium* spp.
- *Alcaligenes* spp.*
- *Bordetella bronchiseptica*
- *Chryseobacterium (Flavobacterium)* spp.*
- *Moraxella* spp.*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas oryzihabitans*
- *Pseudomonas stutzeri*
- *Roseomonas* spp.
- *Shewanella* spp.
- *Sphingomonas paucimobilis*

Testes necessários para a identificação de rotina dos BNFs

- Tubo de OFglicose (com vaselina)
- Tubo de OFglicose (sem vaselina)
- Tubo com lisina
- Tubo controle de aminoácidos
- Tubo ágar citrato
- Tubo ágar uréia
- Tubo com ágar esculina
- Tubo com TSI
- Tubo com gelatina
- Tubo com caldo NaCl 6,5%
- Disco de oxidase
- Disco de PYR
- Tubo com arginina
- Caldo TSB para motilidade em lâmina
- Caldo TSB crescimento 42°C
- Tubo de caldo indol
- Disco de polimixina
- Placa de Mac Conkey
- Placa de DNase

SEMEADURA, LEITURA E INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

A partir de colônias isoladas em cultura pura com 24 horas de crescimento, nos meios de inoculação primária, deve-se proceder a realização das técnicas de identificação e diferenciação dos BNFs:

PROVAS	SEMEADURAS	LEITURA E INTERPRETAÇÃO
Disco de oxidase	<ul style="list-style-type: none">- Retirar 2-3 colônias com alça.- Esfregar sobre a fita ou disco teste; pode umedecer o papel com 1 gota de salina estéril.	<ul style="list-style-type: none">- A leitura é feita em 15 a 20 segundos.- A cor violeta forte aparece rapidamente. Após este intervalo, cores violeta-pálido são falso positivos. A <i>Burkholderia cepacia</i> pode dar reação fraca.

Tubo de OF glicose (com e sem vaselina)	<ul style="list-style-type: none"> - Picar com agulha até o fundo do tubo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentador: dois tubos ficam amarelos (ácido) - Oxidativo: tubo sem vaselina amarelo tubo com vaselina verde - Inerte ou alcalino: dois tubos não mudam de cor (inerte) ou o tubo sem vaselina fica azulado (alcalino). Aguardar, no mínimo, 72h para definir como inerte, pois pode ocorrer a oxidação tardia ou lenta.
Tubo com pedaço de filme e gelatina	<ul style="list-style-type: none"> - Inocular 2-3 colônias na salina. - Deixar o fragmento imerso. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incubar 30°C, se negativo, aguardar no mínimo 72h. Se positivo, ocorre precipitado cinza no fundo do tubo.
Placa de DNase	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 a 3 colônias em "spot" (círculo de 1 cm de diâmetro). 	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar ácido clorídrico e aguardar 5 minutos. - Observar a presença de halo transparente em volta do inóculo positivo enquanto o restante do meio fica leitoso. - Se negativo, repetir o teste com leitura em 72h.
Tubo com lisina, arginina, controle de aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> - Usar inóculo denso; pode adicionar 2 ml de vaselina líquida no tubo com lisina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Comparar os tubos testes dos aminoácidos com o controle negativo. - tubo controle negativo deve ficar azul esverdeado pálido e as provas positivas ficam de cor púrpura. - Se negativo, aguardar até 5 dias.
Uréia	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com agulha inóculo denso na superfície do meio. 	<ul style="list-style-type: none"> - A cor rosa forte aparece em todo o meio após 24 a 72 h de incubação; uma ligeira mudança de cor rósea no ápice, que não progride com maior tempo de incubação, é considerado negativo. - <i>Bordetella bronchiseptica</i>: reação positiva em 4 h.
Citrato	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com agulha na superfície do meio. 	<ul style="list-style-type: none"> - A cor azul forte aparece no pico, e com maior incubação estende-se a todo o meio.
Caldo TSB crescimento 42°C	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ocorre turbidez no meio ou é nítido o aumento da densidade bacteriana. - Ideal comparar com controle mantido a temperatura ambiente.
Caldo TSB motilidade	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agitar o tubo e com uma pipeta com ponteira estéril ou alça bacteriológica estéril. - retirar uma gota e depositar sobre uma lâmina. - Cobrir a gota com uma lamínula e levar ao microscópio. Observar com aumento de 400 vezes (ocular 10x e objetiva 40). - A presença de bactérias cruzando o campo em diferentes direções é significativo de motilidade positiva; movimentos vibratórios fracos = negativo (movimento browniano). Quando o movimento de todas as bactérias é numa mesma direção, provavelmente é o movimento do líquido entre a lâmina e a lamínula. - Verificar a motilidade em temperaturas de 37°C e 20°C (ambiente).
Tubo com caldo NaCl 6,5%	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 a 3 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - A presença de turbidez e mudança de cor indicam crescimento
Tubo com ágar esculina	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 a 3 colônias na superfície do meio. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ocorre precipitado negro intenso nas provas positivas a partir de 6 horas de incubação até 48 h - Cor castanho escuro é prova negativa.
Tubo de caldo indol	<ul style="list-style-type: none"> - Inocular 2 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar 5 gotas de xilol e agitar bem o tubo. - Adicionar 5 gotas do reagente de Erlich ou Kovacs. - Observar a presença de anel púrpura-pálido ou intenso que revelam prova positiva.
Disco de polimixina	<ul style="list-style-type: none"> - Fazer antibiograma em Mueller Hinton. - Colocar o disco. 	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer halo em torno do disco significa sensibilidade.

Disco de PYR	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar o disco sobre colônias de crescimento recente ou fazer suspensão densa. - Depositar 3 a 4 gotas sobre o disco de PYR. - Incubar durante 4 horas numa placa vazia com umidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar o disco teste em contato com o crescimento bacteriano. - Colocá-lo sobre uma lâmina. - Depositar uma gota do reagente que acompanha o teste. - A presença de cor alaranjada é prova positiva; mantendo a cor amarela é prova negativa. - Recomenda-se testar controles positivo e negativo.
Placa de Mac Conkey	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com alça 1 colônia isolada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Crescimento deve ocorrer entre 1 a 3 dias.
TSI	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com agulha picando até o fundo do tubo e na superfície do ágar inclinado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentador: presença de cor amarela apenas na base ou no ápice e na base - Com ou sem H₂S e gás: precipitado preto e bolhas. - Não fermentador: permanece vermelho (alcalino) no ápice e na base.

PROCEDIMENTOS PARA A IDENTIFICAÇÃO

No caso de isolar uma bactéria que não foi ainda comprovada como não fermentadora da glicose, seguir as seguintes etapas com a colônia isolada:

Gram e Oxidase: observar se há pigmento da colônia crescida (amarelo, róseo, cor metálica).

RESULTADO DO GRAM E OXIDASE

Gram Positivo:

- Procurar a identificação de cocos e bacilos Gram positivos

Gram negativo:

- Coco Gram negativo, oxidase positivo, identificar como *Neisseria* spp. ou seguir para a Tabela 2
- Coco Gram negativo, oxidase negativo, seguir para Tabela 1

Bacilo Gram negativo, oxidase negativo:

- Semear Fenilalanina, Citrato, Uréia (ou EPM MILI ou IAL)
- Semear OF glicose e Caldo motilidade – seguir [Resultado OF 1](#)

Bacilo Gram negativo, oxidase positivo:

- Semear OF Glicose e Caldo motilidade – seguir [Resultado OF 2](#)

RESULTADO DO OF

1. Bacilo (cocobacilo) Gram negativo oxidase negativo

OF Glicose fermentador:

- Fazer a identificação com as provas realizadas, visto ser uma enterobactéria.
- Vide capítulo enterobactérias para interpretação dos resultados.

OF não fermentador:

- motilidade negativa: Tabela 1
- motilidade positiva: Tabela 3

2. Bacilo Gram negativo oxidase positiva:

- OF Glicose fermentador: pesquisar *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*
- OF Glicose não fermentador:
 - se pigmento rosa, seguir Tabela 7
 - motilidade negativa e pigmento amarelo, seguir Tabela 4
 - motilidade positiva: se TSI com H₂S segue Tabela 5a e 5b; se OF glicose Oxidativo segue Tabela 5; se OF glicose Inerte, seguir Tabela 6

TABELAS DE IDENTIFICAÇÃO DOS BNFS

Tabela 1. Coco-bacilos ou cocos Gram negativo, Oxidase negativa e Motilidade negativa

Microrganismos	OF-glicose	Cresc. 42°C	Citrato	Gelatina
<i>A. baumannii</i>	O	+	+	neg
<i>A. calcoaceticus</i>	O	neg	+	neg
<i>A. haemolyticus</i>	Inerte/oxidativo	neg	+	+
<i>A. lwoffii</i>	inerte	neg	neg	neg

Prova opcional

Microrganismos	Hemólise *
<i>A. baumannii</i>	neg
<i>A. calcoaceticus</i>	neg
<i>A. haemolyticus</i>	+
<i>A. lwoffii</i>	neg

* hemólise em ágar sangue

Tabela 2. Cocos Gram negativo, Oxidase positivo, Motilidade negativa, OF-Gli inerte

Microrganismos	Urease	Gelatina	DNase	Mac Conkey
<i>Moraxella(B) catarrhalis</i>	neg	neg	+	neg
<i>Moraxella canis</i>	neg	neg	+	+
<i>M. fenilpiruvica/ureolytica</i>	+	neg	neg	+
<i>Moraxella lacunata</i>	neg	+	neg	neg
<i>Moraxella</i> spp. *	neg	neg	neg	variável

* *Moraxella* spp.: *nonliquefaciens*, *lincolnii*, *osloensis*, *atlantae* e *Oligella urethralis*

Tabela 3. Bacilos Gram negativo, Oxidase negativa, Motilidade positiva, OF-Gli oxidativo ou inerte

Microrganismos	Arginina	DNase	Lisina	Polimixina *
<i>Pseudomonas luteola</i>	+	neg	neg	sensível
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	neg (14+)	neg	neg	sensível
<i>B. cepacia</i>	neg	neg	80%+	resistente
<i>S. maltophilia</i>	neg	+	93%+	resistente

* Fazer antibiograma com polimixina

Provas opcionais

Microrganismos	Esculina	PYR	Imipenem *
<i>Pseudomonas luteola</i>	+	+	sensível
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	neg	+	sensível
<i>B. cepacia</i>	variável	neg	variável
<i>S. maltophilia</i>	variável	neg	resistente

* Fazer antibiograma com Imipenem

Tabela 4. Oxidase positiva, Motilidade negativa e OFG Oxidativo, Bacilos com pigmento amarelo e Crescimento em MC variável

Microrganismos	Indol	DNase	Polimixina	Uréia
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	+	+	resistente	neg
<i>C. indologenes</i>	+	neg	resistente	neg
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	neg	neg	sensível	neg
<i>Sphingobacterium</i> spp. *	neg	variável	resistente	+

* *S. multivorum*, *S. spiritivorum*

Tabela 5a. Bacilos Gram negativo, Oxidase positiva, Motilidade positiva, OF GLI oxidativo - vide fluxograma para facilitar interpretação

Microrganismos	Polimixina	Lisina	Arginina	NaCl 6,5%	Gelatina	42°C	Característica
<i>A. xiloxidans</i>	sensível	neg	neg	neg	neg	+ 86	
<i>P. aeruginosa</i>	sensível	neg	+		82	+	pigmento
<i>P. fluorescens</i>	sensível	neg	+		+	neg	
<i>P. putida</i>	sensível	neg	+		neg	neg	
<i>P. stutzeri</i>	sensível	neg	neg	+	neg	variável	seca
<i>B. pseudomallei</i>	resistente	neg	+		+79%	+	
<i>B. cepacia</i>	resistente	80%+	neg		20%+	83%+	
<i>S. paucimobilis</i> *	sensível	neg	neg		+	neg	pigm. amarelo
<i>Shewanella</i> spp.	sensível	neg	neg	variável	variável	variável	

* Mot positiva = Temperatura ambiente

Provas complementares ^{1, 2}

Microrganismos	Esculina *	PYR *	Microrganismos	Esculina *	PYR *
<i>A. xiloxidans</i>	neg	+	<i>B. pseudomallei</i>	variável	neg
<i>P. aeruginosa</i>	neg	variável	<i>B. cepacia</i>	variável	neg
<i>P. fluorescens</i>	neg	variável	<i>S. paucimobilis</i> *	+	25+
<i>P. putida</i>	neg	neg	<i>Shewanella</i> spp.	neg	+
<i>P. stutzeri</i>	neg	neg			

* provas da esculina e PYR úteis apenas para diferenciar as bactérias lisina e arginina negativas

Tabela 5b. Bacilos Gram negativos não fermentadores, Oxidase positiva, Motilidade positiva, com H₂S no TSI, OF Glicose variável, DNase positiva

Bactéria	Cresc. 42°C	NaCl 6,5%
<i>Shewanella putrefaciens</i>	neg	neg
<i>Shewanella alga</i>	+	+

Fluxograma Auxiliar para Tabela 5

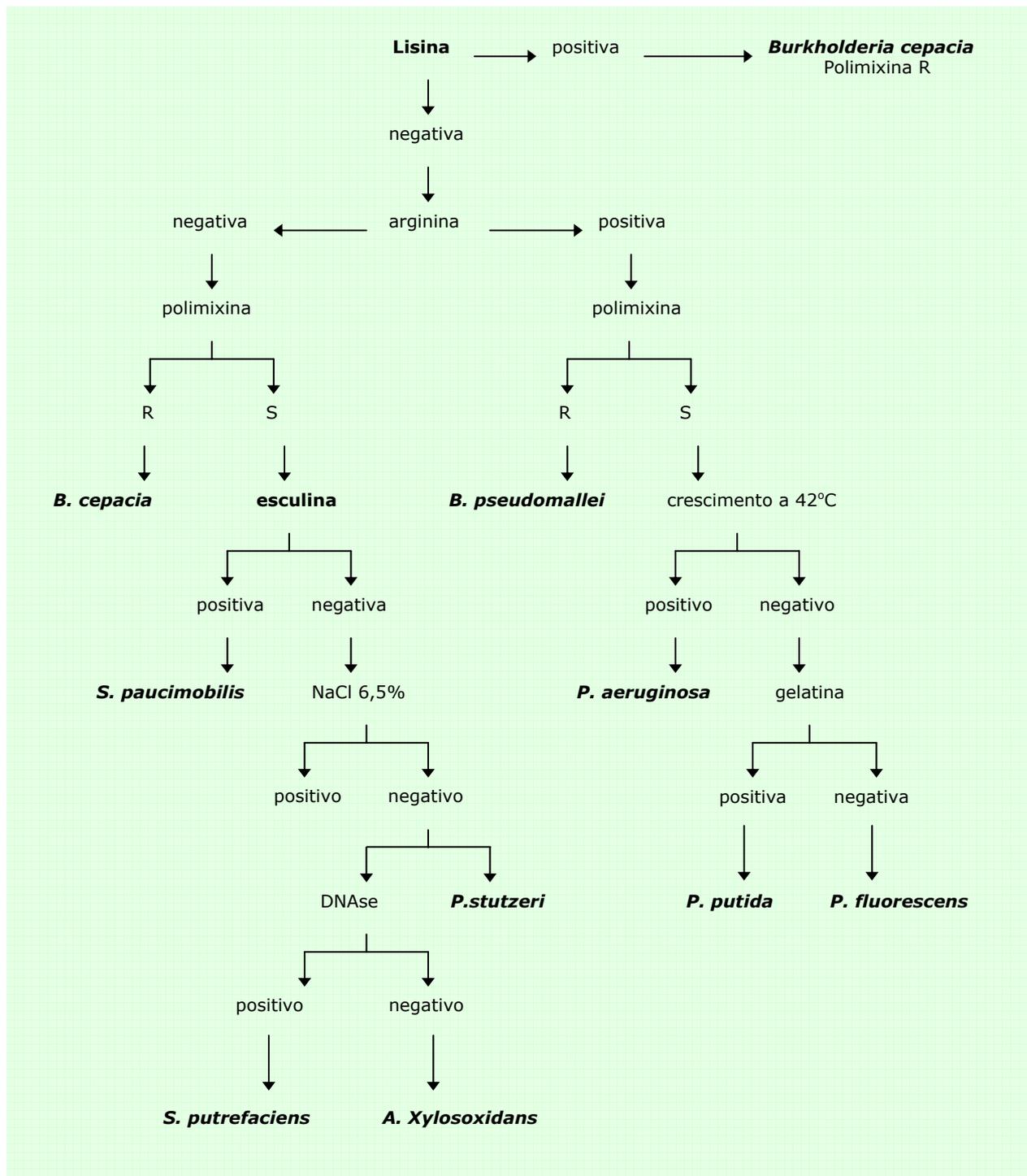


Tabela 6. Bacilos Oxidase positiva, Motilidade positivo, OF-Gli alcalino - incubar 72 h.

Microrganismos	Uréia	NaCl 6,5%	DNase
<i>A. denitrificans</i>	variável	neg	neg
<i>Alcaligenes faecalis</i>	neg	+	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	++	neg	neg
<i>S. malthophilia</i> *	neg	78% neg	+

*raramente pode ser oxidase positiva

Prova complementar 2

Microrganismos	PYR
<i>A. denitrificans</i>	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	neg
<i>S. malthophilia</i>	neg

Tabela 7. Bacilos e coco-bacilos Gram negativos não fermentadores, Oxidase positiva, OF Glicose variável, com pigmento róseo (1)

Microrganismos	Motilidade	Morfologia	Urease	Mac Conkey	Cresc. 42°C	Obs.
<i>Methylobacterium</i> spp.	+	bacilos	+	neg	neg	colônia seca coral
<i>Roseomonas</i> spp.	variável	Coco-bacilos	+	+	+	colônias mucóides rosadas

TABELAS DE CONSULTA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NÃO FERMENTADORES

Oxidase e motilidade negativos

Microrganismos	OXI	MOT	Morf.	OF-G	Cresc. a 42°C	CIT	MAL	GEL	HEM
<i>A. baumannii</i>	neg	neg	coco	O	+	+	+	neg	neg
<i>A. calcoaceticus</i>	neg	neg	coco	O	neg	+	+	neg	neg
<i>A. haemolyticus</i>	neg	neg	coco	Inerte/oxidativo	neg	+	neg	+	+
<i>A. lwoffii</i>	neg	neg	coco	inerte	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	neg	neg	coco	Inerte/oxidativo	neg	+	variável	variável	variável

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia CIT = citrato MALO = malonato GEL = gelatina
 OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson HEM = hemólise em ágar sangue

Oxidase negativo e Motilidade positiva

Microrganismos	Oxidase	Motilidade	Morfologia	OF-Glicose	Imipenem
<i>P. luteola</i>	neg	+	bacilo	oxidativo	sensível
<i>P. oryzihabitans</i>	neg	+	bacilo	oxidativo	sensível
<i>S. maltophilia</i>	neg	+	bacilo	85% oxid.	resistente
<i>B. cepacia</i>	14% neg	+	bacilo	oxidativo	resistente

Microrganismos	Esculina	Dnase	Lisina	Argina	Mac Conkey	42°C
<i>P. luteola</i>	+	neg	neg	+	+	94%+
<i>P. oryzihabitans</i>	neg	neg	neg	14%+	+	33%+
<i>S. maltophilia</i>	39%+	+	+	neg	+	48%+
<i>B. cepacia</i>	63%+	neg	80%+	neg	+	83%+

Oxidase positiva, Motilidade negativa, OF-Glicose oxidativo

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF-G	Uréia	Indol	DNase	MC	Poli
<i>C. meningosepticum</i>	+	neg	bacilo	oxidativo lento	neg	+	+	variável	resistente
<i>C. indologenes</i>	+	neg	bacilo	oxidativo lento	neg	+	neg	variável	resistente
<i>S. paucimobilis</i> ¹	+	Neg ²	bacilo	oxidativo	neg	neg	neg	variável	sensível
<i>Sphingobacterium</i> spp.	+	neg	bacilo	oxidativo	var	neg	variável	variável	resistente

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia MC = Mac Conkey Poli = polimixina

OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson

¹ pode ser motilidade positiva a 20°C

² a 37°C

Oxidase positiva, Motilidade negativa, OF-Glicose inerte e cocóide

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF-G	Uréia	GEL	DNase	MC
<i>M. catarrhalis</i>	+	neg	coco	inerte	neg	neg	+	neg
<i>M. canis</i>	+	neg	coco	inerte	neg	neg	+	+
<i>M. fenilpiruvica / ureolytica</i>	+	neg	coco	inerte	+	neg	neg	+
<i>M. lacunata</i>	+	neg	coco	inerte	neg	+	neg	neg
<i>Moraxella</i> spp. * raras	+	neg	coco	inerte	neg	neg	neg	variável

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia MC = Mac Conkey GEL = gelatina

OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson

* *Moraxella* spp.: *nonliquefaciens*, *lincolnii*, *osloensis*, *atlantae* e *Oligella urethralis*

Oxidase positiva, Motilidade positiva e OF-Glicose inerte ou alcalino

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF-G	MC	Uréia	CIT	Nat\ ito	Nit\ gás	Cresc. 42°C
<i>A. denitrificans</i>	+	+	bacilo	alcalina	+	nt		+	+	
<i>A. piechaudii</i>	+	+	bacilo	alcalina	+	neg		+	neg	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	bacilo	alcalina	+	neg		neg	+	
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	coco- bacilo	alcalina	+	++		+	neg	
<i>Comamonas</i> spp.	+	+	bacilo	inerte	+	neg	+	+	neg	variável
<i>P.pseudoalcaligenes</i>	+	+	bacilo	inerte	+	neg	variável	+	neg	+
<i>P. alcaligenes</i>	+	+	bacilo	inerte	+	neg	variável	54+	neg	neg

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia MC = Mac Conkey CIT = citrato
 OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson
 nt= não testado (não citado na literatura)

Oxidase positiva, Motilidade positiva e OF-Glicose oxidativo

Microrganismos	Oxidase	Motilidade	Morfologia	OF-Gli	Cresc. 42°C
<i>A. xiloxidans</i>	+	+	bacilo	oxidativo	nt
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	bacilo	oxidativo	+
<i>P. fluorescens</i>	+	+	bacilo	oxidativo	neg
<i>P. mendocina</i> (rara)	+	+	bacilo	oxidativo	+
<i>P. putida</i>	+	+	bacilo	oxidativo	neg
<i>P. stutzeri</i>	+	+	bacilo	oxidativo	69
<i>S. paucimobilis</i>	+	+	bacilo	oxidativo	nt
<i>B. cepacia</i>	86% +	+	bacilo	oxidativo	83% +
<i>B pseudomallei</i>	+	+	bacilo	oxidativo	+
<i>S. putrefaciens</i>	+	+	bacilo	oxidativo	V

nt= não testado (não citado na literatura)

Microrganismos	Gelatina	Esculina	Polimixina	Mac Conkey	Lisina	Arginina
<i>A. xiloxidans</i>	nt	neg	sensível	+	nt	variável
<i>P. aeruginosa</i>	82% +	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. fluorescens</i>	+	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. mendocina</i> (rara)	neg	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. putida</i>	neg	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. stutzeri</i>	neg	neg	sensível	+	neg	neg
<i>S. paucimobilis</i>	nt	+	sensível	variável	nt	neg
<i>B. cepacia</i>	20% +	63% +	resistente	+	80% +	neg
<i>B pseudomallei</i>	79% +	59% +	resistente	+	neg	+
<i>S. putrefaciens</i>	variável	neg	sensível	+	neg	neg

nt= não testado (não citado na literatura)

Bactérias não fermentadoras com pigmento rosa

Microorganismos	OXI	MOT	Morf	OF-Gli	Uréia	Mac Conkey	Cresc. 42°C	Obs.
<i>Methylobacterium</i> spp.	+	+	bacilo	variável	+	neg	neg	Colônia seca coral, bacilos com vacúolos
<i>Roseomonas</i> spp.	+	variável	coco-bacilo	variável	+	+	+	Colônias mucóides rosadas cocobacilos

OXI = oxidase

MOT = motilidade

Morf = morfologia

5. BACIOS CURVOS OU ESPIRALADOS

INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta os principais bacilos curvos ou espiralados de importância clínica, relacionados às principais patologias, fontes de infecção e recursos diagnósticos para sua caracterização. Por se tratar de agentes raros, com exceção dos *Campylobacter* spp., não serão abordados em profundidade, devendo o microbiologista encaminhar a cepa isolada para Laboratório de Referência ou consultá-lo sobre recursos disponíveis para tentativa de isolamento.

PRINCIPAIS BACTÉRIAS CURVAS OU ESPIRALADAS

Agente	Doença	Reservatório	Transmissão
<i>Arcobacter</i> spp.	Bacteremia gastroenterite	Gado, humanos	Alimentos ¹
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Doença de Lyme	Roedores	Carrapatos
<i>Borrelia recurrentis</i>	Febre recorrente epidêmica	Humanos	Sarna (<i>P.humanus</i>)
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	Gastroenterite	Alimentos contaminados	Alimentos ¹
<i>Campylobacter fetus</i>	Bacteremia, infecção extraneointestinal	Humanos	Fecal-oral
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, úlcera péptica	Humanos, macacos, gatos	Fecal-oral
<i>Helicobacter</i> spp.	Gastroenterite, bacteremia, etc.	Animais domésticos	Fecal-oral, alimentos
<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirose	Cães, gatos, porcos, ratos	Alimentos-água ²
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	Humanos	Sexual
<i>Vibrio</i> spp.	Gastroenterite	Alimentos, água	Alimentos ¹

¹- Ingestão de alimentos e água contaminados

²- Alimentos ou água contaminados com urina de animal infectado

RECURSOS DIAGNÓSTICOS

Agente	Testes *
<i>Arcobacter</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopia: bacilos Gram negativos curvos ou helicoidais - Cultura: cresce entre 15 a 30°C em ambiente específico de combinação de gases em CAMPY-CVA. - Sorologia: Não disponível
<i>Borrelia burgdorferi</i> (doença de Lyme)	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopia: espiroquetas coradas por coloração de prata de Warthinneg Starry ou anticorpos marcados por fluoresceína em tecidos - Cultura: meio BSK II em microaerofilia entre 30-37°C por 6 semanas - Sorologia; Imunofluorescência e ELISA
<i>Borrelia</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopia: espiroquetas coradas pelo Giemsa, Wright de amostras de sangue - Cultura igual de <i>B. burgdorferi</i>
<i>Campylobacter coli</i> e <i>C. jejuni</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopia: bacilo fino e curvo, Gram negativo, mas mal corado pelo Gram. - Cultura: cresce a 37 e 42°C em ambiente específico de combinação de gases em Campy-CVA
<i>Campylobacter fetus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopia: bacilo fino e curvo, Gram negativo, mas mal corado pelo Gram - Cultura: cresce em ágar sangue a 37°C, mas não a 42°C em ambiente específico de combinação de gases

<i>Helicobacter pylori</i>	-	Microscopia: biópsia gástrica corada por H&E, Giemsa ou coloração pela prata de Warthin-Starry.
	-	Recurso rápido; teste da urease em biópsia gástrica (sensibilidade >90%)
	-	Cultura: cresce em meios seletivos ou não em microaerofilia a 37°C por 5-7 dias
	-	Sorologia: útil para determinar doença ativa por Enzima-Imunoensaio
<i>Leptospira spp.</i>	-	Pesquisa no sangue, LCR e urina: microscopia em campo escuro (baixa sensibilidade) ou por imunofluorescência direta
	-	Cultura: primeiros 10 dias de doença - LCR e sangue colhido com heparina em meio de Fletcher incubado à temperatura ambiente por 2 a 16 semanas. Cultura do sedimento urinário alcalinizado após a 1ª semana da doença.
	-	Sorologia: aglutinação ou ELISA são sensíveis e específicos
<i>Treponema pallidum</i>	-	Linfa de lesões observadas em campo escuro ou coloração pela prata (Fontana); presença de espiroquetas. Imunofluorescência direta mais sensível
	-	Sorologia: VDRL ou FTA-abs são muito úteis para diagnóstico

* Recursos não citados: não úteis ou não disponíveis

BSK II = meio de Barbour Stoenner-Kelly

Campy-CVA= Meio seletivo para *Campylobacter* com cefoperazona, vancomicina e anfotericina.

CAMPYLOBACTER

MATERIAL

Em caso de gastroenterite colher fezes e enviar rapidamente ao laboratório ou em meio de transporte de Cary-Blair semi-sólido. Em amostras de sangue colhidas em meios convencionais, estas podem suportar o crescimento do *C. fetus* que é a espécie que causa com maior frequência infecções extra-intestinais.

MICROSCOPIA

A coloração de Gram deve usar no lugar da safranina a carbol-fucsina ou fucsina básica a 0,1% durante 2 minutos. Exame de fezes costuma revelar presença de leucócitos, mas a ausência não contra-indica a cultura ou a suspeita diagnóstica. O Gram das fezes tem sensibilidade entre 70 a 90% e elevada especificidade.

Principais espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter*

Bactéria	Catalase	H ₂ S-TSI	Cresc. 15°C	Cresc. 25°C	Cresc. 42°C	Mac Conkey	Ácido Nalidixico	Cefalotina
<i>C. jejuni</i>	+	neg	neg	neg	+	+	sensível ou resistente	resistente
<i>C. coli</i>	+	neg	neg	neg	+	+	sensível	resistente
<i>C. fetus</i>	+	neg	neg	+	neg	+	sensível ou resistente	sensível
<i>Campylobacter</i> spp.	variável	+	neg	neg	+	variável	sensível ou resistente	sensível *
<i>Arcobacter</i>	+	neg	+	+	variável	variável	sensível	variável

* *C. lari* = resistente

ISOLAMENTO

A maioria das espécies de *Campylobacter* exige microaerofilia contendo cerca de 5% de CO₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (microaerofilia), obtidos com geradores específicos e não apenas com vela. Para aumentar a chance de isolamento em fezes recomenda-se a filtração das fezes em filtro de acetato de celulose >0,45 µm. Vários são os meios de cultura específicos para coprocultura por serem seletivos, sendo na atualidade os mais recomendados o ágar carvão desoxicolato cefoperazona, o meio Campy CVA (Cefoperazona, Vancomicina e Anfotericina) e o meio de Karmali (base de Columbia ágar, carvão ativado e suplemento de antibióticos).

Amostras de hemocultura devem ser repicadas em meios não seletivos com geradores para microaerofilia. Fazer o teste de crescimento a 25, 37 e 42°C (todos crescem a 37°C). No exame direto em gota direto no microscópio entre lâmina e lamínula pode-se observar a motilidade tipo hélice em movimento.

As provas de crescimento devem ser feitas em ágar Mueller Hinton com 5% de sangue de carneiro em microaerofilia. O teste de sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina pode ser feito em qualquer meio não seletivo e será considerado sensível a presença de qualquer tamanho de halo.

VIBRIOS, AEROMONAS E PLESIOMONAS

A suspeita da presença de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* é evidenciada pelo:

- Isolamento de bactéria Gram negativa fermentadora da glicose (TSI fermentador) e oxidase positiva.
- Materiais clínicos que podem, eventualmente, ser associados com maior frequência de isolamentos de *Vibrios*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*.

Principais bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva e sua associação com diferentes quadros clínicos:

Bactéria	Diarréia	Infecções partes moles	Sepse	Outros
<i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	freqüente	pouco comum	raro	raro
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	freqüente	raro	freqüente *	raro
<i>Aeromonas hydrophila</i>	freqüente	frequente	freqüente	freqüente
<i>Aeromaonas caviae</i>	freqüente	raro	freqüente	freqüente
<i>Aeromonas veronii</i>	freqüente	raro	freqüente	freqüente

* associado à meningite em recém-nascidos

VIBRIO

As espécies do Gênero *Vibrio* são bacilos curvos ou às vezes retos, longos, anaeróbios facultativos, móveis, fermentadores da glicose, em geral sem produzir gás, e oxidase positivas. Além do *Vibrio cholerae*, existem mais de 10 espécies patogênicas para o ser humano. Algumas espécies podem causar gastroenterite, outras infecções cutâneas e bacteremias.

A cólera, é causada pelo *V. cholerae* produtor de toxina (dois biotipos: clássica e El Tor), responsável por diarréia secretória disseminada por via fecal-oral (água e alimentos contaminados) em surtos e epidemias associadas à falta de condições sanitárias adequadas. O quadro clínico pode variar de assintomático a diarréia aguda com morte em 5 horas por desidratação e distúrbio eletrolítico. Casos esporádicos podem ocorrer por ingestão de ostras e outros pescados crus ou mal cozidos.

A coleta do material quando for fecal deverá ser feita utilizando o meio de transporte de Cary & Blair, e as cepas suspeitas ou confirmadas de *Vibrio* deverão ser encaminhadas a Laboratório de Referência, para registro epidemiológico.

Algumas outras espécies de *Vibrios* além do *V. cholerae* necessitam de NaCl para crescimento. Ágar sangue e Mac Conkey permitem o crescimento da maioria das espécies, e neste último meio as colônias são semelhantes a de bastonetes não fermentadores. A diferença é que no TSI, EPM ou IAL há fermentação da glicose, como ocorre também com *Aeromonas* e *Plesiomonas*. São oxidase positivas, a maioria é esculina negativa, DNase positivo e quase todos crescem em caldo com NaCl 6%.

AEROMONAS E PLESIOMONAS

Vivem em ambientes aquáticos em todas as partes do mundo. Podem ser encontradas em água de fonte, água de lagos, águas poluídas, etc. *Plesiomonas* preferem águas tropicais e não marinhas, sendo a *Aeromonas* mais tolerante às diferentes condições. *Aeromonas* têm sido isoladas em carnes, meio ambiente aquático e produtos do mar, e suas diferentes espécies causam doenças não só no homem como em animais, peixes, répteis, cobras e pássaros.

Em nossa experiência é comum o isolamento de *Aeromonas* em abscesso pós-picada de cobra, líquido biliar em pacientes com colicistite, diarreia, sepse (em pacientes com doença hepática crônica) e abscessos cutâneos pós-acidentes (corto-contusos) em lagos, tanques, etc. A chance de detectar *Aeromonas* e *Plesiomonas* depende da adoção do procedimento em se fazer o teste da oxidase em bactérias com características de *Escherichia coli* lactose negativa.

As principais características das *Aeromonas* são: lactose negativa, H₂S negativo, fenilalanina negativa, indol positivo, motilidade positiva, e crescem bem em meios ricos e seletivos (Mac Conkey e Salmonella-Shigella).

Principais provas diferenciais entre *Aeromonas* spp., *E.coli* e *Citrobacter* spp.

Bactérias	Citrato	Uréia	Lisina	H ₂ S	Lactose	Gás
<i>E. coli</i>	neg	neg	+	neg	+	+
<i>Citrobacter</i> spp.	+	variável	neg	variável	variável	+
<i>Aeromonas</i> spp.	variável	neg	+	neg	neg ¹	variável

¹- *Aeromonas caviae*: lisina negativa e lactose positiva

Provas diferenciais para bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva: *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*

Provas	<i>V. cholerae</i>	Outros vibrios	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Plesiomonas</i> spp.
Cresce sem NaCl ¹	+	neg ²	+	+
Cresce com 6% NaCl ¹	+	+	neg	neg
Oxidase	+	+	+	+
DNAse	+	+	+	neg

¹- crescimento em caldo nutriente

²- exceto *V. mimicus*

Provas para diferenciar as principais espécies de *Aeromonas* e *Plesiomonas*

Bactérias	Indol	LIS	ARG	ORN	ARA	LAC	SAC	ESC	HEM *
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	neg	+	neg	+	+	+
<i>A. caviae</i>	+	neg	+	neg	+	+	+	+	neg
<i>A. sobria</i>	+	+	+	neg	neg	neg	+	neg	+
<i>A. veronii</i>	+	+	neg	+	neg	neg	+	+	+
<i>A. jandaei</i>	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg	+
<i>A. schubertii</i>	neg	+	+	neg	neg	neg	neg	neg	Variável
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg

LIS = lisina ARG = arginina ORN = ornitina ARA = arabinose LAC = lactose SAC = sacarose ESC = esculina HEM * = hemólise / sangue carneiro

6. BACILOS GRAM POSITIVOS

INTRODUÇÃO

Este capítulo aborda os aspectos práticos para identificação dos principais bacilos Gram positivos de importância clínica.

Bactérias consideradas:

Corineformes	<i>Arcanobacterium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>G. vaginalis</i> , <i>Oerskovia</i> spp., <i>Rhotia</i> spp.
Bacilos Gram positivos regulares	<i>Erisipelotrix</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Kurthia</i> spp.
Esporulados	<i>Bacillus</i> spp.
Bacilos ramificados (Actinomycetos)	<i>Nocardia</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp.

Bactérias Gram positivas que são citadas no texto para fins de diagnóstico diferencial, mas que foram abordadas em outros capítulos são:

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">▪ <i>Actinomyces</i> spp. (anaeróbios)▪ <i>Clostridium</i> spp. (anaeróbios)▪ <i>Lactobacillus</i> spp. (anaeróbios)▪ <i>Mycobacterium</i> spp. (micobactérias) | <p>Outros anaeróbios:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ <i>Mobiluncus</i> spp.▪ <i>Propionibacterium</i> spp.▪ <i>Eubacterium</i>▪ <i>Bifidobacterium</i> spp. |
|--|---|

Os *Actinomyces* spp. e alguns *Propionibacterium* spp. embora anaeróbios, podem ser aerotolerantes, e crescer em aerobiose.

ORIENTAÇÃO GERAL NA IDENTIFICAÇÃO DE BGPS

Para triagem inicial dos Bacilos/cocobacilos Gram positivos, algumas observações e provas são fundamentais:

- Colher material com antisepsia rigorosa para evitar contaminação.
- Mesmo em líquidos estéreis há risco de contaminação, por isso pede-se a coleta de no mínimo duas hemoculturas. No LCR o resultado do Gram do sedimento e a presença de neutrofilia reforçam a hipótese de ser agente infeccioso.
- Valorizar o achado em pacientes imunocomprometidos.
- Procurar sempre ter bacterioscopia do material clínico onde foi isolado o Bacilo Gram Positivo (BGP) e verificar se há predomínio do agente em questão; é relevante o achado dentro de macrófagos / neutrófilos.
- Valorizar materiais nobres (sangue, LCR, pericárdico, etc.), biópsias, aspirados de abscessos, LBA, etc., desde que a bacterioscopia e o quadro clínico sejam compatíveis.
- Cuidado com contaminação por bactérias da flora de mucosas.
- Em caso de abscessos é interessante fazer semeadura quantitativa (com alça calibrada), sendo sugestivo o isolamento de $>10^4$ UFC/ml.
- Em urina é sugestivo quando isolado como único agente, bacterioscopia concordante, leucocitúria, sintomas de infecção urinária e contagem $>10^5$ UFC/ml.
- Observar características da colônia: cor, tamanho, cheiro, consistência, hemólise, etc.
- Testar em quais meios cresce o BGP e suas condições de incubação.
- Para observar esporos e hifas aéreas algumas vezes é necessário deixar a colônia envelhecer ou crescer em meios pobres.

- É sempre interessante semear em meio sólido e em caldo para observar variação morfológica; observar ramificações em diferentes condições e meios de cultivo.
- Fazer coloração de Ziehl ou de Kinyoum para pesquisa de álcool-ácido resistente.
- Lembrar que este grupo de bactérias pode variar muito nas características morfológicas quando observado no material clínico culturas jovens, culturas velhas, meios sólido ou líquido, meio rico ou pobre, etc., sem que represente contaminação ou cultura mista. No entanto, algumas destas bactérias são habitantes de mucosas e podem causar infecção mista associada ou não com anaeróbios estritos.

CORINEFORMES

São classificados como corineformes as seguintes bactérias:

- *Corynebacterium* spp.
- *Arthrobacter* spp.
- *Brevibacterium* spp.
- *Curtobacterium* spp.
- *Exiguobacterium* spp.
- *Arcanobacterium* spp.
- *Microbacterium* spp.
- *Aureobacterium* spp.
- *Turicella* spp.
- *Dermabacter* spp.
- *Gardnerella* spp.
- *Rothia* spp.
- *Cellulomonas* spp.

Entre os corineformes foram selecionados aqueles de maior importância clínica, sendo recomendável a caracterização e provas diferenciais apenas dos gêneros:

- *Corynebacterium* spp.
- *Arcanobacterium* spp.
- *Gardnerella* spp.
- *Rothia* spp.

PRINCIPAIS DOENÇAS ASSOCIADAS AOS BACILOS GRAM POSITIVOS

Bactéria	Quadro clínico
<i>Actinomyces</i> spp., <i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. odontolyticus</i> e outros	Actinomicose, doença granulomatosa predominante cervico-facial
<i>Arcanobacterium</i> spp., <i>A. nhaemolyticum</i>	faringite, infecção de partes moles, endocardite, etc
<i>Bacillus</i> sp, <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i>	Antraz, intoxicação alimentar, sepse e pneumonia em imunossuprimidos e neutropênicos
<i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i>	difteria
<i>C. jeikeium</i>	endocardite, bacteremia
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Zoonose, linfadenite e abscessos
<i>Erysipelotrix</i> sp	celulite em veterinários e zona rural
<i>Gardnerella</i> spp.	vaginose, endometrite, pós-parto
<i>Lactobacillus</i> spp.	flora oro-intestinal e vaginal, raríssimo patógeno
<i>Listeria</i> spp.	meningite, sepses, aborto
<i>Nocardia</i> spp.	abscesso cerebral, abscesso pulmonar, etc. em imunocomprometidos
<i>Oerskovia</i> spp.	bacteremia, infecção associada a corpo estranho
<i>Rhodococcus</i> spp.	pneumonia, abscessos, etc. em imunocomprometidos
<i>Rothia</i> spp., <i>R. dentocariosa</i>	endocardite, bacteremia, infecções respiratórias
<i>Streptomyces</i> spp.	Oportunista, infecções de partes moles, etc.

Triagem inicial para Bacilos e Cocobacilos Gram positivos

Bactéria	Esporo	Anaer.	AAR *	Ramif.	Hemólise	Catalase	Obs.
<i>Actinomyces</i> spp.	neg	+	neg	neg	neg	V	
<i>Arcanobacterium</i> spp.	neg	neg	neg	raro /curto	beta	neg	Pleomórfico
<i>Bacillus</i> spp.	+	neg	neg	neg	variável	+	
<i>Clostridium</i> spp.	+	+	neg	neg	variável	neg	
<i>Corinebacterium</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	variável	paliçada
<i>Erisipelotrix rhusiopathie</i>	neg	neg	neg	neg	alfa	neg	H ₂ S +
<i>Gardnerella vaginalis</i>	neg	neg	neg	neg	beta /coelho	neg	Gram lábil
<i>Lactobacillus</i> spp.	neg	+	neg	neg	neg	variável	
<i>Mobiluncus</i> spp.	neg	+	neg	neg	neg	neg	móvel
<i>Listeria</i> spp.	neg	neg	neg	neg	beta	+	móvel
<i>Mycobacterium</i> spp.	neg	neg	+	variável	neg	+	cresc. lento
<i>Nocardia</i> spp.	neg	neg	+	+	neg	+	col. laranja
<i>Oerskovia</i> spp.	neg	neg	neg	variável	neg	+	col. amarela
<i>Ppropionibacterium</i> spp.	neg	+	neg	+	neg	variável	
<i>Rhodococcus</i> spp.	neg	neg	variável	variável	neg	+	col. coral
<i>Rhotia dentocariosa</i>	neg	neg	neg	+	neg	+	Pleomórfico
<i>Streptomyces</i> spp.	neg	neg	neg	+	neg	+	raro, hifas

* AAR = alcool-ácido resistente

É importante destacar que os corineformes correspondem a um grupo não homogêneo de bactérias com poucas características em comum sendo também morfológicamente muito distintos:

CORYNEBACTERIUM SPP

O gênero *Corynebacterium* compreende cerca de 50 espécies, sendo cerca de 30 de algum interesse médico.

Estas espécies podem ser diferenciadas por provas como:

- OF glicose
- redução de nitrato
- urease
- utilização de diferentes carboidratos
- reação de CAMP

Principais características:

- não se ramificam
- não são alcool-ácido resistentes
- catalase positivas
- imóveis
- esculina e gelatina negativas

MORFOLOGIA

Variam muito na morfologia das diferentes espécies, e mesmo mesmas culturas em diferentes condições de cultivo. São bacilos Gram positivos, retos ou ligeiramente curvos, com extremidades em geral arredondadas, com a forma de clava, podendo apresentar arranjos característicos em paliçada ou letras chinesas, podendo ou não apresentar grânulos metacromáticos, que são melhores visualizados através da coloração de Albert-Laybourn, e que caracterizam as bactérias conhecidas como difteróides. As corinebactérias de maior importância clínica são catalase positivas, imóveis podendo ser fermentadoras ou não.

São muitas as corinebactérias que se pode isolar em material clínico, entretanto, é de pouco interesse aprofundar na caracterização destas espécies, exceto para fins de pesquisa ou epidemiológicos.

CORINEBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Considera-se fundamental o laboratório de microbiologia poder caracterizar ou afastar a possibilidade de isolamento das espécies de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* que podem produzir a toxina diftérica. Outra espécie de importância em infecções hospitalares e frequentemente isolada em material clínico é a *C. jeikeium*.

Difteria

Em virtude da vacinação compulsória, a difteria na atualidade é uma doença rara em pacientes imunizados, mas de importância epidemiológica quando detectada. A infecção caracteriza-se por processo infeccioso localizado no trato respiratório e manifestações tóxicas no coração e nervos periféricos.

Quadro clínico	Coleta de material	Processamento do material	Bacterioscopia
<p>Ocorre dor de garganta, dificuldade de deglutição, presença de pseudomembrana purulenta, dor no corpo, cefaléia, náuseas e febre.</p> <p>A morte pode ocorrer por obstrução respiratória ou por miocardite. Pode ocorrer difteria cutânea com lesões necróticas e, eventualmente, presença de pseudomembrana.</p>	<p>O material de orofaringe ou nasofaringe deve ser colhido das bordas, abaixo da pseudomembrana purulenta.</p>	<p>Semear em meios não específicos como ágar sangue e ágar chocolate para pesquisa do <i>Streptococcus pyogenes</i> e outros patógenos eventuais, e encaminhar outro swab em meio de transporte para o laboratório de referência.</p> <p>Os meios específicos para a pesquisa de bacilo diftérico são os meios de enriquecimento de Loeffler e o meio seletivo e diferencial ágar sangue-cistina-telurito.</p>	<p>A bacterioscopia do esfregado do material, bem como do crescimento no meio de Loeffler, após coloração de Gram pode ser sugestiva caso sejam visualizados bacilos difteróides, melhor caracterizados pela coloração de Albert-Laybourn.</p> <p>A identificação bioquímica das Corynebactérias potencialmente produtoras de toxina é difícil em laboratório não especializado. Recomenda-se, nestes casos, encaminhar o material ou contactar o Laboratório de Referência para orientação.</p>

PROVAS DIFERENCIAIS PARA OS CORINEFORMES

Bactéria	Catalase	O/F ¹	Motilidade	Uréia	Esculina	CAMP Reverso	Hemólise
<i>Arcanobacterium</i> spp.	neg	F	neg	neg	neg	+	beta
<i>C. diphtheriae</i>	+	F	neg	neg	neg	neg	neg
<i>C. jeikeium</i>	+	O	neg	neg	neg	neg	neg
<i>C. ulcerans</i> <i>/Pseudotuberculosis</i>	+	F	neg	+	neg	+	neg
<i>Corinebacterium</i> spp.	+	F	variável	variável	neg	neg	neg
<i>Gardnerella vaginalis</i>	neg	F	neg	neg	neg	neg	beta ²
<i>Oerskovia</i> spp.	+	F	variável	neg	+	neg	neg
<i>Rhotia</i> spp.	variável	F	neg	neg	+	neg	neg

¹ Base CTA (cystine tripticase ágar) O = oxidativo e F = fermentador

² ágar sangue de coelho

C. PSEUDOTUBERCULOSIS

Importância clínica	Deve ser lembrado nos casos de veterinários ou trabalhadores de zona rural com quadro de linfadenite, linfangite ulcerativa ou abscesso relacionado a manuseio de aborto de gado. Esta espécie pode ser produtora de toxina diftérica.
Isolamento e Identificação	As colônias são pequenas, branco-amareladas, urease positiva, CAMP reverso positivo (inibe a beta-hemólise do <i>S. aureus</i> em ágar sangue com hemácias de carneiro).

C. JEIKEIUM

Características gerais	Colônia pequena cinza ou translúcida, a bacterioscopia é um pequeno coco-bacilo gram positivo, resistente a vários antibióticos (beta-lactâmicos, gentamicina, etc).
Importância clínica	Associada a septicemia, endocardite, infecções de pele e tecido subcutâneo. Infecções mais severas podem ocorrer em imunossuprimidos, como meningite, pneumonia e peritonite ou associada a próteses e procedimentos invasivos.
Isolamento e Identificação	Cresce em BHI com 1% de Tween 80, sendo lipofílica e não em caldo BHI sem Tween 80. Apresenta metabolismo oxidativo na base CTA, enquanto a maioria das <i>Corynebacterium</i> spp. de importância clínica são fermentadoras. Oxida a glicose, é uréia negativa, esculina negativa, PYR positiva.

ROTHIA * DENTICARIOSA

Características gerais	São bacilos Gram positivo retos, sendo alguns ramificados.
Importância clínica	Pertence à microbiota da cavidade oral, e está raramente associada à endocardite.
Isolamento e Identificação	As colônias são brancas salientes e às vezes rugosas. São fermentadores da glicose e esculina positiva.

* *Rhotia* spp.: São pleomórficos podendo apresentar-se tanto na forma cocóide como de bacilos. São catalase positiva, imóvel e fermentador.

ARCANOBACTERIUM SPP.

Características gerais	São bacilos delicados e curvos e alguns apresentam dilatação terminal e ramificações rudimentares.
Importância clínica	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> tem sido considerado juntamente com <i>S. pyogenes</i> como agentes patogênicos em orofaringe, identificados e relatados com a finalidade de tratamento. Está associado com infecções de partes moles, faringite em jovens e raros casos de septicemia, endocardite e osteomielite.
Isolamento e Identificação	Crescem em 24-48h como colônias pequenas e hemolíticas. Colônias mais velhas tendem a adquirir a forma de coco-bacilo, que pode ser confundido com estreptococos. Em caldo tendem a formar ramificações e em anaerobiose filamentosos. São bacilos Gram positivos irregulares, catalase negativa, imóveis e fermentadores. Espécies <i>A. haemolyticum</i> , <i>A. pyogenes</i> e <i>A. bernardiae</i> são hemolíticas, têm a hemólise melhor visualizada em sangue de coelho, e crescem melhores em CO ₂ . Pode se apresentar como dois tipos de colônias no mesmo cultivo: lisas, mucóides e brancas ou secas e cinza. Produz a prova de CAMP reverso (inibição da hemólise).

GARDNERELLA SPP.

Características gerais	São pequenos bacilos ou coco-bacilos irregulares, que se coram irregularmente pela violeta. A principal espécie é a <i>Gardnerella vaginalis</i> , que tem uma classificação taxonômica incerta, e portanto para fins didáticos, estudada com os coryneformes.
Importância clínica	Faz parte da microbiota vaginal de cerca de 70% das mulheres em idade reprodutiva, mas está associada à vaginose bacteriana, quando predomina na flora vaginal em substituição ao <i>Lactobacillus</i> de Doderlein. A vaginose bacteriana e a presença de <i>Gardnerella</i> estão associadas também ao parto prematuro, ruptura prematura de membranas e corioamnionite. Esta bactéria é comumente isolada em hemoculturas de pacientes com febre puerperal e pós-aborto. Pode causar sepse em recém-nascidos e raramente infecção urinária em adultos.
Isolamento e Identificação	Crescem no ágar sangue humano e de coelho produzindo hemólise beta, mas sem hemólise no ágar sangue de carneiro. São visualizadas e caracterizadas no exame citológico e/ou no Gram pela presença das "clue cells", que são células epiteliais abarrotadas de pequenos bacilos Gram lábeis, de modo a perder sua definição morfológica. É pleomórfica, Gram variável (ora Gram negativa ora parcialmente e fracamente Gram positiva), imóvel, sem cápsula. É um anaeróbio facultativo, fermentador lento, catalase e oxidase negativas.

OERSKOVIA SPP.

Características gerais	São microrganismos cocóides ou na forma de bacilos resultantes da quebra de micélios, apresentam ramificação, hifas vegetativas, sem hifas aéreas e penetração no ágar. <i>Oerskovia turbata</i> e <i>O. xanthineolytica</i> são bactérias do meio ambiente ou solo, com pouca importância clínica, com raros casos de bacteremia e infecções em implantes de próteses.
Isolamento e Identificação	Cresce bem em ágar sangue de carneiro e no ágar chocolate. Cresce mal no meio de Sabouraud dextrose. O crescimento, quando ocorre, é visível após 24-48h em anaerobiose ou 5% CO ² . Apresentam colônias amareladas, catalase positiva em aerobiose, oxidase negativa. Fermentador da glicose, sacarose e lactose, hidrolisa gelatina, amido e esculina; motilidade variável.

BACILOS GRAM POSITIVO

LISTERIA

Características gerais	São bacilos uniformes, não ramificados, apresentando-se só ou em pequenas cadeias. A única espécie importante para o homem entre as sete espécies conhecidas é a <i>L. monocytogenes</i> . Móvel a temperatura ambiente (25 a 28°C) e imóvel a 37°C. Encontrada na natureza no solo, em matéria orgânica em decomposição, água, leite e derivados, carne, etc. Sendo encontrada como microbiota de diversos mamíferos, aves, peixes, e insetos.
Importância clínica	Tem importância clínica particularmente para idosos e imunocomprometidos causando meningite, encefalite ou septicemia. Na grávida a infecção pode causar amnionite, infecção do feto com aborto, parto prematuro, meningite neonatal e sepse neonatal. Pode ocorrer em surtos, em geral relacionados a contaminação de alimentos.
Isolamento e Identificação	Crescem em ágar sangue, ágar Chocolate, CLED, ágar nutriente, TSA e ágar Mueller Hinton, mas não em Mac Conkey. As colônias são pequenas, crescendo melhor entre 30 a 37°C, e crescem também à temperatura ambiente e a 4°C em três a quatro dias. A partir de hemoculturas, LCR, placenta, alimentos, água, etc., semear em ágar sangue de carneiro, coelho ou cavalo, com base TSA, embora cresça também com outras bases (Mueller Hinton, Columbia, Brucella, BHIA, etc). Existem meios seletivos indicados em investigações epidemiológicas. Bacilo Gram positivo anaeróbio facultativo, catalase positiva, oxidase negativa, que produz ácido de glicose. Hemólise beta em ágar sangue de carneiro, CAMP positivo, motilidade positiva à temperatura ambiente, hidrólise da esculina positiva e NaCl 6,5% positiva. É Além disso, é verificada prova da esculina rapidamente positiva, assim como uréia, gelatina, indol e H ₂ S negativas.

ERYSIPELOTRIX RHUSIOPATHIAE

Características gerais	Bacilo Gram positivo curto, de extremidades arredondadas, anaeróbio facultativo, não esporulado, não álcool-ácido resistente, ocorre só em cadeias curtas ou longas, sem ramificar. Existe na natureza, em matéria orgânica, urina, fezes e carcaça de animais. Vive em animais, peixes e pássaros e causa erisipela em porcos. No homem causa uma zoonose (doença ocupacional de veterinários e manuseadores de carne e animais) caracterizada por celulite que aparece no local da inoculação após 2 a 7 dias.
Importância clínica	A lesão costuma ser violácea e com muita dor, acompanhada de edema endureado, sem supuração e bem delineado nas bordas. Ocorre linfangite regional e artrite adjacente. Disseminação da doença e endocardite podem ocorrer, particularmente em imunossuprimidos, cujo prognóstico é grave. Cicatrização pode ocorrer em 2 a 4 semanas ou meses, com possibilidade de recaída.
Coleta do material	Material ideal para isolamento é a biópsia colhida de maneira asséptica. Swab da lesão em geral é negativa, pois o agente encontra-se na profundidade da borda endurecida.
Isolamento e Identificação	Cresce em ágar sangue, ágar chocolate, caldo tripticase soja, a 35°C aerobiose ou 5% de CO ₂ . Cresce entre 5 a 42°C e em caldo NaCl 6,5%. No ágar sangue cresce em 24 a 72h, como colônias minúsculas, lisas e transparentes, mas o outro tipo de colônia, maior, rugosa e chata pode aparecer, bem como uma hemólise esverdeada em baixo da colônia no ágar sangue. As colônias lisas são bacilos ou coco-bacilos Gram positivos, às vezes corando-se mal pelo Gram Catalase negativa, imóvel, esculina negativa, fermenta lentamente a glicose sem produzir gás, uréia e indol negativos, mas caracteriza-se por crescer no TSI produzindo H ₂ S; é lactose positiva e sacarose negativa.

KURTHIA

Características gerais	São bacilos Gram positivos grandes em cadeias ou em paralelo, ou filamentos não ramificados e em culturas velhas tendem a ficar cocóides ou bacilos curtos. Vivem no meio ambiente, na água, solo, animais, sua carne e seus derivados.
Importância clínica	Seu papel clínico é questionado, pois não há relatos recentes de isolamento em casos significativos.
Isolamento e Identificação	Crescem em ágar sangue como colônias de cor creme não hemolíticas, podendo ser confundidas com <i>Bacillus</i> spp. São aeróbios estritos, não esporulados, não álcool-ácido resistentes; são móveis, catalase positiva e não fermentadores.

Principais diferenças entre bacilos e coco-bacilos Gram positivos

Bactéria	Gram	Catalase	Motil. 25°C	Hemólise	CAMP test	NaCl 6,5% Esculina
<i>Listeria monocytogenes</i>	bacilo curto ou coco-bacilo regular e largo	+	+	beta	+	+ / +
<i>Enterococcus</i> spp.	cocos ou coco-bacilos em cadeias	neg	neg	Alfa, beta gama	neg	+ / +
<i>Streptococcus</i> beta hemolíticos	cocos em cadeias	neg	neg	beta	neg ¹	neg / neg
<i>Lactobacillus</i> spp.	coco-bacilos e cadeias longas	neg	neg	não	neg	neg / neg
<i>Kurthia</i> spp. ²	bacilo grande, cadeias, cocóide em cultura velha	+	+	não	neg	neg / neg
<i>Corynebacterium</i> spp.	bacilos e coco-bacilos pleomórficos	+	neg	variável	neg	variável / neg
<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i> ³	coco-bacilo ou filamentos longos	neg	neg	alfa	neg	neg / neg

¹- Só *S. agalactiae* (beta do grupo B) é positiva

²- Não usa glicose

³- H₂S positivo

Bacilos Gram positivos anaeróbios que devem ser diferenciados:

- **Lactobacillus spp.** - flora da boca, intestino e flora vaginal (Bacilo de Doderlein). São anaeróbios estritos mas crescem em ágar sangue e ágar chocolate como colônias muito pequenas. São imóveis e catalase negativa. Sem valor patogênico.
- **Mobiluncus** - bacilos Gram positivos anaeróbios estritos, curvos, móveis que vivem na trato genital humano e reto. Encontra-se aumentado nos casos de vaginose, juntamente com a *Gardnerella*.
- **Propionibacterium spp., Eubacterium spp. e Bifidobacterium spp.** - anaeróbios estritos que são analisados juntamente com os demais anaeróbios.

BACILOS ESPORULADOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS FACULTATIVOS

Gênero Bacillus compreende cerca de 50 espécies de bacilos anaeróbios facultativos que podem exibir a forma esporulada, corando-se mal pela violeta, quando em colônia mais velhas. As formas vegetativas são retas largas, podendo ser grandes, isolados ou em cadeias. A forma e localização dos endosporos são úteis para sua classificação:

- podem ser cilíndricos, ovais, redondos, e eventualmente com forma de feijão
- posição central, sub-terminal, terminal
- dilatando ou não a célula mãe

Todos são móveis, exceto o *B. anthracis* e *B. mycoides* e a maioria é catalase positiva. Na presença de íon bicarbonato (HCO_3^-) e em anaerobiose ou CO_2 os *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. megaterium* apresentam cápsula polipeptídica.

Habitat e importância clínica - Os *Bacillus* spp. encontram-se basicamente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal nas condições mais variadas de temperatura, umidade, pH, etc. As duas espécies mais importantes e que devem ser reconhecidas pelo laboratório de microbiologia são o *B. anthracis* e *B. cereus*.

Principais espécies de Bacillus relacionadas à infecção

Espécie de <i>Bacillus</i>	Quadro clínico	Frequência de relatos
Anthraxis	- Anthrax cutâneo	- Bastante frequente
	- Anthrax intestinal	- Raro
	- Anthrax pulmonar	- Raro
Cereus	- Necrose ou gangrena em partes moles	- Bastante frequente
	- Bacteremia e sepse	- Frequente
	- Intoxicação alimentar	- Muito frequente
	- Infecções pulmonares, endocardite, meningite, osteomielite e endoftalmite	- Frequente
Circulans	- Infecções de partes moles, abscessos, bacteremia e sepse	- Frequente
Licheniformis	- Bacteremia e sepse	- Pouco frequente
	- Intoxicação alimentar	- Frequente
Subtilis	- Intoxicação alimentar	- Muito frequente
	- Bacteremia, sepse, endocardite e infecções respiratórias	- Raro

Bacillus cereus

Pode apresentar dois tipos de intoxicação:

- Caracterizado por diarreia, dor abdominal, que aparecem 8 a 16 h após a ingestão do alimento contaminado (carnes, vegetais, leite, molhos, massas, doces, bolos).
- Caracterizado por náuseas e vômitos que aparecem 1 a 5 horas após a ingestão do alimento contaminado, principalmente arroz, mas pode ser os mesmos alimentos acima.

Bacillus anthracis

Características gerais	No passado era causa importante de mortalidade no gado, sendo os herbívoros altamente suscetíveis, sendo reduzida pela vacinação e melhores condições de higiene. O homem pode adquirir a doença em contato com animais doentes (trabalhadores área rural e veterinários), no manuseio industrial de ossos, lã, crina, e outros produtos animais e de forma eventual, sendo a forma cutânea quase a totalidade dos casos, com raros episódios intestinais pela ingestão de carne contaminada. Potencial risco elevado na comunidade quando usado como arma biológica.
Quadro clínico	<p>A forma cutânea não tratada pode ser fatal (menos de 20% dos casos), principalmente quando a lesão é próxima a cabeça ou pescoço. As formas pulmonares e intestinais são mais graves pela dificuldade de diagnóstico. No local de inoculação da forma cutânea aparece após 2 a 3 dias uma pequena mancha ou pápula, seguida no dia seguinte de um anel de vesículas em torno da pápula, que ulcera, seca, escurece formando uma escara característica que cresce, fica mais espessa e aderente aos planos profundos. O edema pode ser importante, mas tem a característica de ser indolor e sem pus.</p> <p>A forma intestinal é semelhante à forma cutânea atingindo a mucosa com lesões e eventualmente gastroenterite.</p> <p>No antraz pulmonar o esporo inalado é transportado pelos macrófagos do pulmão para o sistema linfático onde os esporos germinam e causam septicemia que é fatal. Atenção ao fato de que evolução nos casos fatais é inicialmente caracterizada por sintomas leves como fadiga, mal-estar e febre baixa, ou às vezes até sem sintomas, quando repentinamente se instala dispnéia, cianose, febre elevada, desorientação, falência circulatória, choque, coma e morte em poucas horas. Em geral a bacteremia é importante.</p>
Coleta de material	Swab do exudato de lesões podem ser úteis; na escara, remover a crosta e colher material com swab ou com tubo capilar, usando luvas. Na forma intestinal, fezes podem ser colhidas. Pós-morte, sangue venoso ou de sangramento de mucosas (sangue não coagula) pode evidenciar o bacilo na bacterioscopia. No antraz pulmonar a hemocultura é útil nos casos graves, mas o material pulmonar oferece menor chance de isolamento.
Isolamento e Identificação	<p>Em casos clínicos os <i>Bacillus</i> estão na forma vegetativa, mas em alimentos, produtos secos de animais (ossos, crina, pelo) o <i>Bacillus</i> deverá estar em forma esporulada e haverá necessidade de ativá-los a 62,5°C por 15 minutos (choque térmico).</p> <p>Os <i>Bacillus</i> crescem com facilidade em meios pobres ou ricos. Dependendo do material (ex: fezes) poderá haver necessidade de usar meio seletivo com adição de polimixina (100.000U/L). Colônias grandes de cor creme crescem no ágar sangue.</p>

Diferenças entre *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp.

Bacillus spp.

- Endosporos em aerobiose
- Catalase positivos

Clostridium spp.

- Endosporos em anaerobiose
- Catalase negativos

Diferenças entre *B. cereus*, *B. anthracis* e espécies relacionadas

Espécies	Colônia no AS *	Motilidade	Hemólise	Penicilina	Citrato	Lecitinase
<i>B. cereus</i>	esverdeado claro	+	+	resistente	+	+
<i>B. anthracis</i>	branco acinzentado	neg	neg	sem	variável	fraco +
<i>B. thurigiensis</i>	esverdeado claro	+	+	resistente	variável	+
<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycoides</i>	rizóides / espalhando	neg	fraco +	resistente	+	+

* ágar sangue de carneiro

O *B. anthracis* virulento pode ser testado para produção de cápsula semeando-se em ágar nutriente com 0,7% de bicarbonato de sódio em jarra com vela. O crescimento será mucóide e a cápsula poderá ser evidenciada com a tinta da china.

ACTINOMICETOS

Grupo de bactérias Gram positivo que apresentam como características em comum a produção de filamentos ou hifas vegetativas, sendo que alguns também apresentam hifas aéreas, semelhanças de composição de parede e padrão de ácidos graxos celulares.

Neste grupo serão abordados os seguintes gêneros:

- *Nocardia* spp.
- *Rhodococcus* spp.
- *Streptomyces* spp.

O gênero *Oerskovia*, embora apresente hifas vegetativas, é analisado juntamente com os corineformes. Outros actinomicetos raros ou de menor importância clínica não considerados são: *Gordona* spp., *Tsukamurella* spp., *Actinomadura* spp., *Nocardiopsis* spp.

Informações importantes sobre Actinomicetos

Para a adequada caracterização dos Actinomicetos, que apresentam alguma semelhança morfológica com os fungos, é importante considerar:

- A origem do material, valorizando os abscessos.
- A quantidade de microrganismos isolados e correlação com a bacterioscopia do material.
- Possibilidade de contaminação com bactérias da mucosa oral.
- Pigmento da colônia.
- Análise morfológica da bactéria pelo microcultivo em lâmina idêntico ao utilizado na secção de Micologia, empregando ágar fubá sem dextrose a 25°C.

Identificação presuntiva de actinomicetos

Gênero	Micélio aéreo	Conídio	Metabolismo glicose
<i>Nocardia</i>	+		oxidativo
<i>Rhodococcus</i>	neg	neg	oxidativo
<i>Oerskovia</i>	neg	neg	fermentativo
<i>Rhotia</i>	neg	neg	fermentativo

NOCARDIA SPP.

Características gerais	São bacilos Gram positivo ramificados e filamentosos, aeróbios estritos, catalase positivo, imóveis, que se fragmenta em bacilos e cocos irregulares. Produz hifas aéreas à medida que o cultivo envelhece. Existem 12 espécies sendo as mais importantes <i>N. asteroides</i> e <i>N. brasiliensis</i> .
Importância clínica	Está associada ao solo e vegetais. As formas clínicas podem ser bem distintas: pulmonar (abscessos), extra-pulmonar localizada, sistêmica, sistema nervoso central (abscessos), partes moles e micetoma. É considerada uma bactéria oportunista, pois a maioria dos casos não cutâneos e micetomas ocorrem em pacientes imunocomprometidos.
Coleta de material	Quando colhido o material por punção, biópsia ou mesmo swab da lesão profunda, deve ser processado rapidamente; existe uma característica do material descrita como grânulos de enxofre, especialmente nos micetomas.

Isolamento e Identificação	<p>Não é bactéria exigente, crescendo em ágar sangue, ágar chocolate, ágar Sabouraud dextrose, ágar seletivo para <i>Legionella</i> e Lowenstein Jensen. Cresce entre 72h a 14 dias. Com exceção da <i>N. asteroides</i>, a maioria das nocardias apresentam beta-hemólise em ágar sangue de carneiro. Crescem em meio de parafina (como fonte única de carbono), juntamente com <i>Rhodococcus</i> e algumas micobactérias.</p> <p>Em microcultivo é possível visualizar as hifas ramificando-se em angulo reto, podendo apresentar ramificações secundárias, bem como hifas aéreas. Em cultura mais velhas em ágar tornam-se visíveis as hifas aéreas nas colônias rugosas. As micobactérias de crescimento rápido podem apresentar ramificações bem curtas em ângulo agudo e sem ramificações secundárias.</p> <p>Uma característica importante é a cor das colônias em Sabouraud dextrose ágar ou mesmo em outros meios:</p> <ul style="list-style-type: none"> - salmão ou laranja claro – <i>N. asteroides</i> - laranja escuro – <i>N. brasiliensis</i> <p>A <i>Nocardia brasiliensis</i> é uréia positivo, citrato positivo e gelatina positiva. A <i>Nocardia asteroides</i> é uréia positivo, citrato variável e gelatina negativa.</p>
Bacterioscopia e Histologia	<p>A bacterioscopia pode revelar bacilos irregulares com ramificações e parcialmente ou fracamente álcool-ácido resistentes pelo Ziehl ou coloração de Kinyoun. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina caracterizam os grânulos, mas não os filamentos da bactéria. O Gram ou a coloração de metenamina prata de Gomori são úteis.</p>

RHODOCOCCUS SPP.

Características gerais	<p>O <i>R. equi</i> é uma bactéria oportunista, causando pneumonia em imunocomprometidos, apresentando uma evolução lenta e granulomatosa, com infiltrados que evoluem para cavitação. Pode causar também abscessos no sistema nervoso central, tecido subcutâneo, linfadenite, etc.</p> <p>Diagnóstico clínico diferencial deve ser feito com micobactérias, fungos, nocardia e actinomyces. Hemoculturas com elevada frequência podem ser positivas.</p>
Coleta de Material	<p>Lavado bronco-alveolar (LBA), biópsias, hemocultura e mesmo escarro. Em material clínico o <i>Rhodococcus</i> pode ser visualizado no interior de macrófagos e extra-celular, na forma de cocos ou coco-bacilos. Em hemoculturas, LBA e escarro eventualmente pode ser observado na forma filamentosa.</p>
Isolamento e Identificação	<p>Em microcultivo o <i>R. equi</i> cresce de forma típica como coco-bacilo ou bacilo em zig-zag. Em Heart Infusion ágar (HIA) cresce em 6 horas a 35°C como bacilo Gram positivo e em 24 horas apresenta-se cocóide. A forma de ramificações rudimentares a partir dos filamentos pode ocorrer em culturas jovens em meio líquido.</p> <p>Em HIA cresce entre 28 e 35°C, entre 2 a 4 dias, mas não a 45°C. Pode crescer na forma de colônias rugosas (com hifas aéreas) ou lisas ou mucóides. Pode apresentar a cor coral ou rosa pálido que são mais freqüentes, mas pode ser amarela ou incolor.</p> <p>A coloração pelo Ziehl ou Kinyoun pode revelar a fraca álcool-ácido resistência.</p>

STREPTOMYCES SPP.

Características gerais	<p>Alguns milhares de espécies de <i>Streptomyces</i> já foram caracterizados, sendo na quase totalidade saprófitas. O <i>Streptomyces somaliensis</i> é responsável pelo micetoma de cabeça e pescoço. Outras espécies foram identificadas em casos de pericardite crônica e infecções de partes moles pós-traumáticas (<i>S. griseus</i>).</p>
Isolamento e Identificação	<p>O abscesso pode revelar a presença de grânulos duros. O Gram vai revelar uma massa de bacilos Gram positivo finos.</p> <p>Não é fastidioso, cresce em Sabouraud dextrose melhor incubado a temperatura ambiente entre 4 a 10 dias. Pode-se visualizar no microcultivo hifas finas e longas com ramificações, hifas aéreas e conídios (via assexuada de propagação com forma arredondada).</p> <p>Não é álcool-ácido resistente, e apenas os conídios podem apresentar esta propriedade; metaboliza a glicose por oxidação e cresce a 50°C. As colônias são mais secas com, diferentes pigmentos (creme, marron, preto, etc) e presença ou não de hifas aéreas. Uma característica importante das colônias é o cheiro de terra molhada.</p>

7. FASTIDIOSOS

INTRODUÇÃO

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FASTIDIOSOS

Este grupo heterogêneo de bactérias apresenta como característica comum exigências especiais de condições de cultivo, em relação as enterobactérias e a maioria dos não fermentadores. Estas condições variam para cada microrganismo, podendo ser a necessidade de CO₂, crescimento lento com a necessidade de até 30 dias de incubação (*Brucella*), adição de fatores especiais de crescimento, etc.

Pontos-chave para classificação

- São bactérias Gram negativas ou Gram lábeis (coram-se de forma tênue pela safranina).
- Muitos, mas não todos são coco-bacilos e oxidase positivos; não crescem em Mac Conkey.
- Para teste de fermentação de carboidratos exigem uma base mais rica como o CTA (vide capítulo meios de cultura). O inóculo deve ser bem denso e muitas vezes é necessário a adição de 2 ou 3 gotas de soro de coelho ou cavalo para permitir o crescimento nos meios utilizados para provas bioquímicas.
- Exceto as *Capnocytophaga* spp. que crescem formando colônias grandes e com aparência de véu em torno da colônia, os demais fastidiosos crescem lentamente e exigem 48 a 72 horas para as colônias ficarem bem visíveis, embora diminutas.
- Alguns destes potenciais patógenos estão associados a síndromes clínicas bem definidas, embora não frequentes como a brucelose, tularemia, etc. É importante nestes casos obter informações adicionais com o médico assistente ou o paciente/familiares para facilitar o processo de identificação microbiológica.
- Sempre valorizar isolados de hemocultura, principalmente se ocorrer em mais de uma amostra, ou materiais de bom valor preditivo de infecção como o LCR, líquido pleural, pericárdico, sinovial, BAL, etc.
- Cabe destacar que alguns fastidiosos podem positivar sistemas automatizados de hemoculturas e a bacterioscopia pode ser aparentemente negativa tanto pelo pequeno tamanho da bactéria como pela má coloração pela safranina.
- A topografia da fonte de isolamento é uma pista importante, pois diferentes espécies de *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Capnocytophaga*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Kingella*, *Cardiobacterium* podem ser encontrados em pele e mucosas, a *Gardnerella* e *Cardiobacterium* no trato genital, etc.
- Como a alguns exigem tratamento com drogas não habituais, é extremamente importante chegar a definição de gênero ou encaminhar a Laboratório de Referência. Outro motivo relevante para a correta identificação é a importância epidemiológica que o agente possa ter em surtos ou mesmo em casos isolados, como é o caso da brucelose, legionelose e *Bordetella pertussis*.
- A *Pasteurella* spp. embora incluída neste grupo, cresce com facilidade em Ágar Sangue, Ágar Chocolate, comportando-se no TSI como fermentador, mas não cresce em Mac Conkey . É oxidase positiva.
- Alguns dos fastidiosos estão relacionados a contato com saliva, sangue, fezes, através de acidente perfuro-cortante ou mordida de animais domésticos ou silvestres (*Pasteurella*, *Bartonella*, *Francisella* e *Brucella*).
- Destaca-se ainda a necessidade de precauções especiais no manuseio de alguns destes agentes pelo potencial patogênico (*Brucella* e *Francisella*).

Com base na importância clínica e epidemiológica, este grupo de bactérias será dividido em dois grupos:

Grupo A: maior interesse clínico e epidemiológico

Grupo B: casos clínicos esporádicos / microbiota oral humana

GRUPO A - MAIOR INTERESSE CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

Bactéria	Hospedeiro principal	Via de transmissão
<i>Bordetella pertussis</i> <i>/parapertussis</i>	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Bartonella</i> spp.	Gatos, humanos infectados, outros desconhecidos	Mordida ou arranhão de gato; picada de piolho infectado
<i>Brucella</i> spp.	Mamíferos domésticos	Leite e derivados, carne, sangue, secreções de animais doentes
<i>Francisella</i> spp.	Animais silvestres	Picada de carrapato ou mosquito infectado em zona endêmica
<i>Haemophilus</i> spp.	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Legionella</i> spp.	Meio ambiente/água	Inalação de água contaminada
<i>Pasteurella</i> spp.	Animais domésticos/silvestres	Mordida e secreções de animais domésticos e silvestres

GRUPO B - CASOS CLÍNICOS ESPORÁDICOS

Bactéria	Fonte
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Cavidade Oral humana
<i>Cardiobacterium hominis</i>	Cavidade oral humana
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Cavidade oral humana
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Água e solo
<i>Eikenella corrodens</i>	Cavidade oral humana
<i>Kingella</i> spp.	Cavidade oral humana
<i>Streptobacillus</i> spp.	Boca de roedores

As características deste grupo heterogeneo são:

- Dificuldade ou ausência de crescimento em meios ricos como Ágar Sangue e Ágar Chocolate.
- Exigência de incubação em diferentes tensões de CO₂.
- Dificuldade em caracterizá-los, pois exigem meios enriquecidos.
- Crescimento lento e pouca importância clínica, talvez pela dificuldade do seu isolamento e caracterização.
- Os gêneros *Actinobacillus*, *Capnocytophaga* e *Eikenella* tem em comum o fato de pertencerem à microbiota da cavidade oral humana e estarem relacionados à doenças gengivais e, a partir deste foco, doenças sistêmicas.
- *Kingella* e *Cardiobacterium* estão associadas ao trato respiratório humano.
- Diferem deste grupo a *Chromobacterium* que é encontrada na natureza em água e solo e *Streptobacillus* na orofaringe e nasofaringe de camundongos selvagens e de laboratório.

PRINCIPAIS FASTIDIOSOS E DIAGNÓSTICO

Bactéria	Material clínico	Meio específico	Incubação
<i>Bordetella pertussis</i>	Swab nasofaringe	Meio de Bordet & Gengou	7 dias
<i>Bartonella spp.</i>	Sangue, gânglios, biópsias	Ágar chocolate, Ágar sangue carneiro	5 a 15 dias
<i>Brucella spp.</i>	Sangue, aspirado de medula	Rotina de hemocultura ou meio de Castañeda	Até 30 dias
<i>Francisella spp.</i>	Gânglios, biópsias	Ágar chocolate enriquecido	7 dias
<i>Haemophilus spp.</i>	Sangue, LCR, etc.	Ágar chocolate de cavalo	48-72 h até 7 dias
<i>Legionella spp.</i>	Secreções ou aspirados de trato respiratório inferior	Meio específico BCYE *	7 a 14 dias
<i>Pasteurella spp.</i>	Sangue, LCR, lesões	Ágar sangue, Ágar chocolate	24 a 72 h

* ágar extrato de levedura, carvão, com pirofosfato férrico e alfa-cetoglutarato.

PRINCIPAIS PROVAS DIFERENCIAIS ENTRE OS FASTIDIOSOS

Bactérias	Oxidase	Catalase	Motilidade	Ágar Sangue	Ágar Chocolate
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	neg /+ fraco	+	neg	+	+
<i>Bartonella spp.</i>	neg	neg	variável	+	+
<i>Bordetella pertussis</i>	+	variável	neg	neg	neg
<i>Brucella spp.</i>	+	+	neg	+	+
<i>Capnocytophaga spp.</i>	neg	neg	neg	+	+
<i>Cardiobacterium hominis</i>	+	neg	neg	+	+
<i>Chromobacterium spp.</i>	V	+	+	+	+
<i>Eikenella corrodens</i>	+	neg	neg	+	+
<i>Francisella tularensis</i>	neg	+ fraco	neg	neg	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+ fraco	+	neg	neg	+
<i>Kingella spp.</i>	+	neg	neg	+	+
<i>Legionella spp.</i>	+ fraco	+ fraco	+ fraco	neg	neg
<i>Pasteurella spp.</i>	+	+	neg	+	+
<i>Streptobacillus spp.</i>	neg	neg	neg		

BARTONELLA

A classificação taxonômica dos membros do gênero *Bartonella* ainda não é definitiva e agrupa as espécies *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. hensleae*, *B. elizabethae* e *Afipia felis*.

B. bacilliformis - é o agente etiológico da verruga peruana (febre de Oroya), doença restrita aos Andes, caracterizada por profunda anemia, trombocitopenia, adenopatia, mialgia, delírio, coma e alta mortalidade.

B. quintana - é causa de doença febril que atacou soldados na I Guerra Mundial, conhecida como febre das trincheiras e relacionado a picada de piolhos e baixa higiene. Caracterizada por febre e bacteremia com duração variável e ainda não bem conhecida. Casos associados à infecção por HIV foram relatados.

B. henselae - pode apresentar quadro de bacteremia principalmente em imunossuprimidos bem como relacionada à doença da arranhadura do gato. O quadro de bacteremia caracteriza-se de forma insidiosa por fadiga, dores no corpo, perda de peso e com febre progressiva. A doença da arranhadura do gato manifesta-se inicialmente com uma pápula ou pústula cerca de uma semana no local de contato com animal (gato ou cão novo que arranha ou morde). Após 1 a 7 semanas aparece adenopatia regional e 1/3 dos pacientes apresentam febre e em 1/6 ocorre supuração do gânglio, sendo que a maioria evolui sem outros sintomas. A cura espontânea ocorre entre 2 a 4 meses. *B. quintanae* e *B. henselae* podem causar quadro de angiomatose bacilar caracterizado por proliferação neovascular envolvendo pele, gânglios e fígado. *B. elizabethae* ainda é pouco conhecida.

Afipia felis - foi considerada há alguns anos como o agente etiológico da doença da arranhadura do gato, que é hoje atribuída à *B. henselae*. Seu papel patogênico não está bem esclarecido.

Isolamento	<p>As bartonellas podem ser isoladas de hemoculturas, lesões cutâneas biópsias e gânglios. O SPS (polianetol sulfonato) que é o anticoagulante usado nas hemoculturas é inibidor das bartonellas, por isso deve-se usar outro anticoagulante.</p> <p>Quando há suspeita clínica, deve-se incubar por pelo menos sete dias, até 40 dias. Vários meios enriquecidos podem permitir o crescimento das bartonellas. O caldo infusão coração de preparo recente, com 5-10% de sangue desfibrinado de coelho ou cavalo são adequados, como também o ágar chocolate.</p> <p>No Bactec pode crescer, mas não aciona o alarme de CO₂. Exigem umidade a 35-37°C por 3 a 4 semanas. <i>B. bacilliformis</i> e <i>Afipia felis</i> crescem melhor entre 25 a 30°C.</p>
Identificação	<p>Colônias podem crescer rugosas ou lisas, de um mesmo material. São bacilos Gram negativos pequenos, às vezes curvos.</p> <p>As espécies <i>quintana</i> e <i>henselae</i>, que são mais isoladas, são caracterizados pelas seguintes provas: catalase e oxidase negativas, motilidade em lâmina presente e que não é devida a flagelos (não tem), mas a fímbrias, percebendo-se a agitação da célula. O período de incubação é longo (> que sete dias) e a <i>B. henselae</i> é bem aderente ao meio.</p>

Provas para diferenciação de espécies de *Bartonella* e de *A. felis*

Espécies	Catalase	Oxidase	Uréia	Flagelo	Motilidade
<i>B. bacilliformis</i>	+	neg	neg	+	+
<i>B. quintanae</i>	neg		neg	neg	+ *
<i>B. henselae</i>		neg	neg	neg	+ *
<i>B. elizabethae</i>	neg	neg	neg	neg	neg
<i>A. felis</i>		+	+	+	+

* Motilidade por fímbrias

BORDETELLA

Características gerais	O gênero Bordetella compreende as espécies <i>B. pertussis</i> , responsável pela coqueluche ou tosse comprida, e <i>B. parapertussis</i> , com quadro clínico semelhante a coqueluche, mas em geral menos severo. Ambas são patógenos exclusivos dos humanos. A <i>B. bronchiseptica</i> e <i>B. avium</i> são bactérias comensais de mamíferos e aves, causando infecções em cães (tosse dos
-------------------------------	--

Importância clínica	canis) e a <i>B. avium</i> rinotraqueíte em perus. São patógenos oportunistas para humanos que entram em contato com estes animais. Foram classificadas mais recentemente para o gênero <i>bordetella</i> as espécies <i>holmesii</i> e <i>hinzii</i> .
Material clínico e Semeadura	São adequados o swab ou aspirado de nasofaringe e semeadura imediata em meios específicos e em ágar sangue para afastar <i>B. pertussis</i> . Na atualidade não se justifica dispor de meio de Bordet & Gengou ou outro, mas em caso de suspeita solicitar auxílio de Laboratório de Referência. Para fórmula de meios de cultura vide manuais de fabricantes de meios de cultura. A prova de imunofluorescência deve ser utilizada em material de nasofaringe juntamente com a cultura que é mais específica.
Isolamento e Identificação	São, cocobacilos Gram negativos pequenos e aeróbios estritos. A safranina deve ser corada pelo Gram durante 2 minutos para melhorar a coloração. Para <i>B. pertussis</i> e <i>parapertussis</i> os Laboratórios de Referência devem dispor de identificação sorológica para acelerar a identificação.

Provas diferenciais para espécies de *Bordetella*

Espécies	Oxidase	Motilidade	Uréia	Ágar Sangue e Chocolate	B & G ou Regan-Lowe	Salmonella -Shigella
<i>B. pertussis</i> ¹	+	neg	neg	neg	+ 3-6 dias	neg
<i>B. para pertussis</i>	neg	neg	+ em 24h	+	+ 2-3 dias	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	+ em 4h	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. avium</i>	+	+ ²	neg	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. holmesii</i>	neg	neg	neg	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. hinzii</i>	+	+	variável	+	+ 1-2 dias	+

¹- necessita de meio específico: Bordet & Gengou (infusão de batata + glicerol + sangue de carneiro) ou Regan Lowe.

²- mais evidente a 25°C

BRUCELLA

A brucelose é uma doença de sintomas vagos, que cursa de forma insidiosa com febre baixa, calafrios, sudorese noturna, cefaléia, mialgia e artralgia. Pode ser acompanhada na forma crônica de alterações hematológicas importantes como leucopenia, pancitopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, etc.

Importância clínica	Está associado à ingestão de leite e derivados e carne de mamíferos, à veterinários, açougueiros ou trabalhadores rurais que manipulam carne e sangue destes animais e à acidentes em laboratórios. A hemocultura exige tempo superior de 5-7 dias de incubação. É importante a informação médica de suspeita clínica para orientar o laboratório na pesquisa e caracterização do agente.
Material clínico e Semeadura	Sangue, aspirado de medula, aspirado e biópsia de gânglios, fígado, baço, LCR, etc. A partir do segundo dia de febre as hemoculturas podem ser positivas, ocorrendo também hemoculturas positivas em pacientes afebris. Outro recurso utilizado para facilitar o isolamento é o método de lise-centrifugação: <ul style="list-style-type: none"> - Colher 5 a 10mL de sangue em tubo de 50mL com 1,5mL de citrato de sódio a 4% - Adicionar cerca de 40mL de água destilada estéril - Centrifugar 2.000g por 30 minutos - Transferir 0,5mL do sedimento para uma placa de ágar sangue e semear. Pode-se fazer o mesmo com LCR e aspirado de medula. - Incubar 35°C em estufa entre 5 a 10% de CO₂ (com gerador de CO₂ ou estufa apropriada).
Isolamento e Identificação	As brucellas crescem bem em ágar sangue, ágar chocolate, Trypticase Soy Ágar e <i>Brucella</i> ágar. O crescimento é visível com 48 a 72 horas. Colônias são pequenas, brancas a creme, e ao Gram visualizam-se coco-bacilos bem finos e pequenos. São aeróbios OF oxidativos, crescem nos frascos de hemocultura, meio de Thayer Martin, ágar sangue, ágar chocolate,

mas não no Mc Conkey.

Espécies mais importantes são:

- *melitensis*, *abortus*, *suis* e *canis*.
- Uréia positivos: *B. suis* (1 a 30 minutos), *B. canis* (1 a 30 minutos) e *B. abortus* (1 a 2 h) no meio uréia de Christensen.
- H₂S com tira de acetato positivo: *B. abortus* e de *B. suis* (biotipo 1).
- CO₂ para crescimento: biotipos de *B. abortus* e *B. ovis*.

Provas diferenciais entre coco-bacilos Gram negativos

Bactéria	Oxidase	Motilidade	Uréia	Ágar Sangue	Mac Conkey
<i>Brucella</i> spp.	+	neg	+	+	neg
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	+	+	+	+	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	neg	neg	variável	+	+
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	+	neg	+	+	+
<i>Pasteurella</i> spp. *	+	neg	variável	+	neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	neg	variável	neg	neg

* cresce no TSI como fermentador acidificando ápice e base sem gás.

Considerando que a *Brucella* é de difícil caracterização em laboratório não especializado, encaminhar a laboratório de referência para confirmação. Suspeitar quando houver quadro clínico sugestivo, obtendo-se isolado de sangue ou medula, crescimento de coco-bacilos finos pouco corados, oxidase e catalase positivas, que crescem lentamente em ágar sangue ou chocolate. Soroaglutinação é útil como elemento da caracterização.

FRANCISELLA TULARENSIS

É um coco-bacilo pequeno, Gram negativo, imóvel e pleomórfico, aeróbio estrito e capsulado. Apresenta grande resistência no meio ambiente, sobrevivendo semanas em meios úmidos, carcaças de animais, água, lama, etc. Constitui o agente da tularemia, uma doença de animais selvagens e com vários vetores hematófagos. É transmitida principalmente por carrapatos, mas também por mosquitos.

Nos Estados Unidos prevalece o biovar A, mais grave, enquanto que no hemisfério sul prevalece o biovar B que apresenta a forma clínica mais leve, sendo pouco diagnosticada principalmente por desconhecimento do agente.

Fontes de transmissão	Centenas de animais silvestres, incluindo alguns domésticos (incluindo cães, gatos e pássaros), podem ser portadores deste agente. Cerca de uma dezena de diferentes insetos servem de vetores. A transmissão pode ocorrer também em contato direto com animais pela mordida, sangue, carne contaminada e eventualmente água e inalação de aerossóis.
Quadro clínico	<p>É extremamente infectante, devendo ser manipulado em cabine de segurança nível 2 para material clínico e nível 3 para culturas positivas. Bastam 10 microrganismos injetados por via subcutânea ou 25 inaladas para causar a doença.</p> <p>Logo após a penetração do agente, em geral pela pele, aparecem sintomas semelhantes da gripe: febre, tremores, cefaléia e dor generalizada. Após período de incubação de 2 a 10 dias forma-se uma úlcera no local de penetração, que pode durar meses. Os gânglios regionais aumentam e ocorre necrose. Se ocorrer invasão sanguínea, o quadro de endotoxemia típico se manifesta. Estes casos são pouco frequentes e ocorrem quando há grande inoculação ou paciente é imunocomprometido. A mortalidade alcança 60%, ocorrendo toxemia, cefaléia intensa, febre elevada e contínua, com delírios, prostração e choque.</p> <p>A forma úlcero-ganglionar ocorre em cerca de 80% dos casos relatados. A úlcera é endurecida, eritematosa, que não cicatriza. Outras formas relatadas são oculo-ganglionar, em orofaringe, ganglionar sem úlcera, pleuropulmonar e gastrointestinal.</p>

Material clínico e Semeadura	Os materiais que oferecem maior chance de positividade são a partir de raspados de úlceras, biópsias e escarro. A <i>Francisella</i> cresce em ágar chocolate suplementado com Isovitalex®. Laboratório de Referência deve ser consultado sobre recursos disponíveis ou encaminhamento de cepas suspeitas.
Isolamento e Identificação	A bacterioscopia de material clínico de lesões ou biópsias raramente ajuda, pois o microrganismo é muito pequeno e cora mal pelo método de Gram. Este agente deve ser lembrado sempre que houver doença associada a picada de carrapato e formação de úlcera com comprometimento ganglionar. Entretanto, o diagnóstico microbiológico é difícil, sendo na maioria das vezes feito com base em testes de aglutinação em amostras pareadas colhidas com intervalo de 2 a 3 semanas e congeladas a - 20°C.

HAEMOPHYLUS

Diferentes espécies pertencentes ao gênero *Haemophilus* podem ser encontradas como flora normal da nasofaringe e orofaringe, chegando a 50% da população, geralmente cepas não capsuladas, embora também cepas do *H. influenzae b* possam apenas representar colonização (rara nos adultos e cerca de 5% nas crianças).

Para considerar o isolamento de *Haemophilus* é fundamental associar o papel patogênico ao da clínica. Várias são as infecções causadas por *H. influenzae*, sendo *H. influenzae* do tipo b as cepas mais virulentas. Entretanto a partir da década passada, com a disponibilidade de vacinação, houve uma drástica redução na importância desta bactéria nas populações vacinadas.

- Doenças causadas pelo *H. influenzae b* principalmente na infância: Meningite, Epiglotite, Pericardite, Pneumonia, Artrite séptica, Osteomielite, Celulite facial.
- Mais raramente: peritonite e infecção urinária em crianças menores que cinco anos.
- Doenças causadas por cepas não b e não tipáveis (em maiores de 9 anos e adultos associados a doença de base predisponente como neoplasia, AIDS, alcoolismo, DPOC, etc.): Traqueobronquite e pneumonia, Bacteremia, Conjuntivite, Ootite (segunda causa depois do pneumococo), Sinusite.

HAEMOPHILUS APHROPHILUS

Microbiota do trato respiratório superior, especialmente em placas dentárias e sulco gengival; endocardite e abscesso cerebral e mais raramente meningite, pneumonia e bacteremia estão associados a este agente, particularmente em pacientes com comprometimento imunológico. A endocardite não está necessariamente relacionada à lesão valvular prévia, mas a associação com embolia arterial é frequente nestes casos. Existem relatos também de isolamento em otites, sinusites e epiglotites, etc.

Crescem bem em ágar chocolate no isolamento primário e em ágar sangue de carneiro nos subcultivos sem exigência de fatores X e V, mas as colônias são muito pequenas de cor amarelada, cheiro de cola e necessitam de 48 a 72h para boa visualização. Em caldo tem a característica de aderir as paredes do tubo, como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Não crescem em Mac Conkey. Para todos os hemófilos fazer o teste da beta-lactamase para verificar a resistência à penicilina

HAEMOPHILUS DUCREY

É o agente do cancro mole, sendo na atualidade raramente isolado, pela menor incidência da doença, da contaminação das lesões com flora genital e pelo frequente uso prévio de antibióticos.

Colhido de úlceras genitais removendo-se previamente a secreção superficial ou lavando com salina estéril e utilizando um swab. Recomenda-se semear imediatamente e fazer esfregaço a ser corado pelo Gram. Em geral é de difícil cultivo.

Emprega-se ágar chocolate de cavalo com base GC ou Mueller Hinton. A colocação de um disco de vancomicina pode ajudar a inibir bactérias Gram positivas. Na bacterioscopia aparecem coco-bacilos Gram lábeis agrupados e em cadeias como cardumes.

ISOLAMENTO

No isolamento primário no ágar chocolate as colônias costumam ser pequenas de cor beje claro, com odor característico. No ágar sangue ocasionalmente pode-se detectar o crescimento em torno de colônias de *Staphylococcus aureus*, que produz o fator V e é utilizada como prova alternativa à utilização dos discos e denominada prova do satelitismo.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *HAEMOPHILUS*

- Anaeróbio facultativo.
- Não crescem no TSI e no OF-glicose.
- Melhor meio de cultura para *haemophilus influenzae* é o ágar chocolate com sangue de cavalo. A base GC usada para *Neisserias* é indicada, embora os hemófilos cresçam com outras bases como Columbia e Mueller Hinton. Há necessidade de umidade e CO₂ entre 3 a 5% para o *H. influenzae* e *H. aphrophilus*. O ágar chocolate suporta muito bem o crescimento dos *haemophilus*, mas para outros fastidiosos recomenda-se adicionar suplemento de crescimento (vitox®, isovitalex®).
- As diferentes espécies de hemófilos podem dar reação de oxidase positiva fraca e demorada (cerca de 25 a 20 segundos).
- Em amostras de LCR pode ser útil a aglutinação com partículas de látex, mas a confirmação bioquímica e sorológica em laboratório de referência é necessária.
- Antibiograma é realizado em meio padronizado HTM (vide cap. meios de cultura).

PRINCIPAIS PROVAS PARA DIFERENCIAR ALGUMAS ESPÉCIES DE *HAEMOPHILUS*

Espécies	Fator X	Fator V	Hemólise *	Uréia	Indol	GLI	SAC	LAC	Catalase
<i>H. influenzae</i>	+	+	neg	variável	variável	neg	neg	neg	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	variável	+	neg	neg	+
<i>H. parainfluenzae</i>	neg	+	neg	variável	variável	+	+	neg	variável
<i>H. ducrey</i>	+	neg	fraca	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<i>H. aphrophilus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	+	+	+	neg

* Verificar hemólise em ágar sangue de cavalo

GLI = glicose

SAC = sacarose

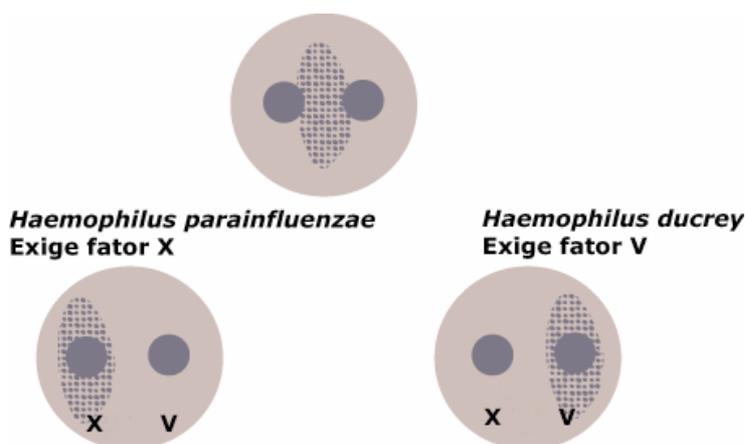
LAC = lactose

Obs.: Fermentação de açúcares com base CTA e 1% de açúcar adicionado de fator X e V (vide cap. meios de cultura); vide leitura de fatores X e V

Técnica para testar fatores X e V:

- Usar meio ágar tripticase soja ou BHI ágar.
- Discos comerciais impregnados com os fatores X=hemina/hematina e V=NAD ou coenzima I.
- Semear a bactéria como se fosse fazer um antibiograma e colocar os discos com pinça a uma distância de 1,5 cm um disco do outro. Flambar a pinça antes e após a retirada de cada disco.
- Após 24h de incubação em jarra com vela e umidade a 35°C, verificar crescimento próximo aos discos:

Haemophilus influenzae: Crescimento entre os discos (exige X e V)



Prova do satelitismo

- Semear com swab uma suspensão em salina cerca de 1 a 2 da escala Mac Farland no centro de uma placa de ágar sangue de carneiro.
- Semear em uma única estria um repique de *S. aureus* hemolítico (ATCC 23922).
- Incubar 18 a 24h em jarra com vela e umidade ou CO₂.
- Verificar crescimento de colônias pequenas próximas a zona de hemólise do estafilococo.
- Encaminhar cepas isoladas de líquidos nobres (sangue, LCR, pleural, pericárdico) a Laboratórios de Referência para confirmação e sorotipagem.

LEGIONELLA

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Pneumonia com ou sem sepsis é a manifestação clínica mais importante, podendo ocorrer infecções de partes moles e sinusite. Está em geral associada a surtos cuja fonte é a água contaminada com este agente. Largamente distribuída na natureza em ambiente úmido e água potável e ocasionalmente em chuveiros. Está associada a presença de outras bactérias e amebas de vida livre na água. A presença de bactérias do gênero *Legionella* em material clínico humano está invariavelmente associada à doença clínica.

ESPÉCIES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Existem algumas dezenas de espécies de *Legionella* sendo a espécie mais importante a *L. pneumophila*, sorogrupos 1 e 6. A doença pode ser sub-clínica, forma não pulmonar, pneumonia e doença extra-pulmonar. A forma não pulmonar tem período de incubação curto (horas a dias), sendo auto-limitada e sem evidências radiológicas de comprometimento pulmonar.

Os sintomas são febre, mal-estar, mialgia e tosse. A pneumonia é a forma mais frequente de manifestação da doença, acompanhada dos mesmos sintomas acima descritos para a forma não pulmonar e em geral com tosse não produtiva. A doença apresenta rápida progressão e nos casos graves, a formação de abscessos são sugestivos da legionelose. Bacteremia é comum e o comprometimento dos mais variados órgãos e tecidos já foi descrito.

MATERIAIS RECOMENDADOS

- Escarro
- Aspirado traqueal e outros que neste caso específico estão indicados como úteis
- Lavado/escovado bronco-alveolar.
- Biópsia pulmonar ou outros tecidos e aqueles obtidos em autópsia.
- LCR e outros líquidos de derrame.
- Urina (pesquisa de antígenos) – conservar a - 20°C.
- Para transporte: usar frasco estéril com água destilada estéril, mas não salina que pode inibir o cultivo. Sempre que possível concentrar os materiais por centrifugação, evitando formar aerossóis.

RECURSOS DIAGNÓSTICOS MAIS UTILIZADOS

Sensibilidade e especificidade de recursos diagnósticos para legionelose

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Observação
Cultura	70%	100%	Método de escolha
Agglutinação pelo látex	55-90%	85-99%	
Imunofluorescência indireta	70-80%	>95%	Útil com cultura ou fins epidemiológicos

Cultura em meio enriquecido	Cresce em meio suplementado com extrato de levedura, l-cisteína, sais de ferro e alfa-cetoglutarato em meio denominado BCYEa ou BCYE, e seu crescimento é favorecido pela incubação em 5% de CO ₂ . Para materiais com microbiota, como para secreção traqueal e escarro, acidificar o meio por 15 minutos a pH 2,0 com tampão ácido (0,2M HCl e 0,2M KCl) e em seguida neutralização a pH 7,0 com KOH 0,1N.
Cultura em meio seletivo	Recomenda-se uso de meio seletivo, adicionando ao meio BCYE os antibióticos: polimixina B, cefamandol e anisomicina ou vancomicina, polimixina B e anfotericina B. Colônias azuladas ou esverdeadas
Cultura em meio diferencial BCYE	Adicionado de glicina, vancomicina, púrpura de bromocresol e azul de bromotimol apresenta as seguintes características: <i>L. pneumophila</i> (branco esverdeado), <i>L. micdadei</i> (colônias azul claro ou acinzentadas), outras legionelas (colônias verde bem claro). Crescem bem no frasco utilizado pelo BACTEC®.

IDENTIFICAÇÃO

São bacilos Gram negativos finos que se coram fracamente pela fucsina e safranina do Gram. Em repiques tornam-se filamentosos.

PROVAS

- Aeróbio estrito
- No primo isolamento a l-cisteína é imprescindível.
- No meio BCYEa o crescimento pode ser observado a partir do 3 ao 5º dia a 35°C.
- Semear o material em ágar sangue como controle, pois a *Legionella* não deverá crescer.
- Aguardar 14 dias para descartar as culturas quando negativas.

CARACTERÍSTICAS DA *L. PNEUMOPHILA*

- oxidase positiva fraca
- catalase positiva
- não sacarolítico (não oxida nem fermenta os açúcares)
- motilidade positiva
- gelatinase positiva
- hidrólise do hipurato positivo
- sensível a macrolídeos, rifampicina, sulfatrim e quinolonas

A identificação com base em testes é difícil. O suspeito deve ser baseado na clínica, no aspecto da colônia, crescimento em meio BCYEa, dependência da l-cisteína, ausência de crescimento em ágar sangue e ágar chocolate não suplementados.

A imunofluorescência direta, com amostras clínicas utilizadas para cultura, é um método complementar para diagnóstico da legionelose. Encaminhar cepas suspeitas a Laboratório de referência para confirmação.

PASTEURELLA

A infecção pela *Pasteurella* constitui uma zoonose, pois se trata de bactéria microbiota de boca e trato respiratório superior de mamíferos e aves. As diferentes espécies estão associadas a infecções humanas relacionadas a mordida dos animais descritos abaixo ou outros tipos de contato com sangue, carne, carcaça, etc.

A *P. multocida* é a espécie mais comumente isolada em material clínico humano, em geral associada a mordida ou arranhadura de cães e gatos. Caracteriza-se pela formação de abscessos ou celulite e eventualmente osteomielite. Infecções respiratórias podem ocorrer, incluindo pneumonia lobar, com ou sem derrame e empiema. Em pacientes imunocomprometidos, com cirrose, neoplasias, podem apresentar bacteremia e septicemia.

Principais espécies de *Pasteurella* e doenças relacionadas

Bactéria	Doenças Relacionadas
<i>P. multocida</i>	Microbiota do trato respiratório de mamíferos e aves (domésticos e silvestres, encontrado na boca de cerca de 50% dos cães e gatos). Pode causar infecções em mamíferos e diarreia em aves.
<i>P. pneumotropica</i>	Trato respiratório de roedores, cães, gatos, etc
<i>P. haemolytica</i>	Infecções pulmonares em bovinos, mastite em ovelhas, sepsse em ovinos e caprinos.
<i>P. aerogenes</i>	Microbiota do trato intestinal de suínos
<i>P. dagmatis (n. sp1)</i>	Trato respiratório de cães e gatos

DIAGNÓSTICO DE ZONOSSES

Para facilitar o isolamento e identificação da *Pasteurella* é muito importante a descrição clínica, pois na suspeita de zoonoses é importante lembrar de: brucelose, pasteurella, micobacterioses, tularemia, leptospirose, yersiniose, etc.

Caracterização microbiológica

- Coco-bacilo Gram negativo ou bacilos – podem ser capsulados
- Anaeróbio facultativo (fermentador) – TSI ácido/ácido
- Oxidase positiva em colônias isoladas em ágar sangue ou ágar chocolate
- Catalase positiva
- Motilidade negativa
- Indol positivo
- Sacarose positiva
- Muitas espécies são ornitina positivas

Provas diferenciais das espécies de *Pasteurella* spp. de importância clínica

Espécie *	Hemólise	Mac Conkey	Indol	Uréia	Ornitina	OF Glicose
<i>P. multocida</i>	neg	neg	+	neg	+	F sem gás
<i>P. pneumotropica</i>	neg	variável	+	+	+	F gás variável
<i>P. haemolytica</i>	+ 72%	variável	neg	neg	variável	F sem gás
<i>P. aerogenes</i>	neg	+	neg	+	variável	F sem gás
<i>P. dagmatis</i>	neg	neg	+	+	+	F com gás

* Todas são oxidase positiva, catalase positiva e fermentadoras da glicose

Obs.: a *P. multocida* cresce bem em ágar sangue de carneiro e ágar chocolate, formando pequenas colônias acinzentadas. Não cresce em ágar Mac Conkey. Tem odor forte característico e podem ser diferenciadas entre si por poucas provas (vide tabela acima), mas dependendo do animal-fonte, outras espécies menos frequentes podem estar envolvidas.

ACTINOBACILLUS

São habitantes das mucosas do trato respiratório e urinário de humanos e animais. As três espécies mais importantes são: *A. actinomycetemcomitans*, *A. urea* e *A. hominis*.

O primeiro está relacionado doença periodontal e particularmente à periodontite juvenil localizada, bem como com endocardite e abscesso cerebral, oriundos da boca. A doença periodontal está associada à endocardite pelos seguintes agentes:

- *A. actinomycetemcomitans*
- *E. corrodens*
- *Cardiobacterium hominis*
- *Kingella* spp.

As outras espécies de *Actinobacillus* são patógenos oportunistas e causam raramente infecções do trato respiratório e bacteremia.

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS PARA DIAGNÓSTICO

São coco-bacilos Gram negativos ou pequenos bacilos que crescem em aerobiose, umidade e 5 a 10% de CO₂ ou anaerobiose em ágar sangue e ágar chocolate. Recomenda-se adicionar suplementos com vitaminas e sangue lisado de carneiro ou cavalo ao ágar chocolate. As colônias ficam bem visíveis com 48 a 72 h de incubação, são brancas acinzentadas, com um pregueamento no centro, fortemente aderentes ao meio e pegajosas no primo isolamento.

Principais características das bactérias fastidiosas analisadas

Bactérias	Características Principais
<i>Actinobacilus</i>	Cocobacilos a bacilos longos, anaeróbios facultativos, colônias cinza, aderentes ao meio, com centro da colônia enrugado
<i>Cardiobacterium</i>	Bacilos que podem apresentar formas semelhantes à gota d'água
<i>Eikenella</i>	Cocobacilos com extremidades arredondadas, cheiro de água clorada, colônias podem corroer o meio
<i>Kingella</i>	Pequenos cocobacilos
<i>Capnocytophaga</i>	Fusiforme e curvo, colônias crescem espalhadas
<i>Streptobacillus</i>	Filamentos longos
<i>Chromobacterium</i>	Pode ter forte pigmento violeta, cresce em Mac Conkey

Provas diferenciais entre os principais fastidiosos

Bactérias	Oxidase	Catalase	CO ₂	Mac Conkey	Uréia	Indol	Glic.	TSI	Motil.
<i>Actinobacilus</i> ¹	neg ou + fraco	+	+	variável	neg	neg	+	ac / ac	neg
<i>Cardiobacterium</i>	+	neg	+	neg	neg	+	+	ac / ac	neg
<i>Eikenella</i>	+	neg	+	neg	neg	neg	neg	alcalino	neg
<i>Kingella</i>	+	neg	+	neg	neg	neg	+	alcalino	neg
<i>Capnocytophaga</i>	neg ²	neg ²	+	neg	neg	neg	+	n cresc. ³	neg
<i>Streptobacillus</i>	neg	neg	+	neg	neg	neg	+	n cresce	neg
<i>Chromobacterium</i>	variável	+	neg	+	neg	neg	+	alc / ac	+

positivo ou neg = 80% ou mais das provas positivas ou negativas ac= ácido alc = alcalino

¹ - *A. actinomycetemcomitans*

² - origem humana. As de origem animal são oxidase e catalase positivas.

³ - pode acidificar lentamente

CAPNOCYTOPHAGA

As espécies de *Capnocytophaga gingivalis*, *granulosa*, *haemolytica*, *ochracea* e *sputigena* fazem parte da microbiota da cavidade oral humana, enquanto outras espécies podem ser encontradas na boca de animais domésticos. O isolamento de *Capnocytophaga* ocorre com maior frequência em bacteremias nos pacientes neutropênicos com mucosite, mas estão também implicadas na doença periodontal juvenil (*gingivalis* e *ochracea*), periodontite em adultos (*sputigena*) e isoladas em placas dentais supragengivais em adultos (*granulosa* e *haemolytica*). As doenças localizadas (ceratites, abscessos e endoftalmite), bem como doenças sistêmicas (septicemia, endocardite, osteomielite, etc.) ocorrem em pacientes imunocomprometidos ou não.

MORFOLOGIA E CULTIVO

A morfologia da *Capnocytophaga* é bem característica, facilitando a sua suspeita, pois lembra um *Fusobacterium* aerotolerante. Tem as extremidades afiladas e o centro mais largo, podendo ser encurvada e eventualmente cocóide.

Para cultivo, crescem melhores com 5 a 10% de CO₂ e em anaerobiose, o que pode confundir com o anaeróbio estrito, se não for feita a prova de crescimento em aerobiose com CO₂. Chama a atenção o fato de crescer melhor em ágar sangue de carneiro que no ágar chocolate sem suplemento de vitaminas. Não crescem em Mac Conkey. O crescimento pode ocorrer com 24 a 72 h. A colônia é chata e sua borda é irregular; com maior incubação nota-se o espalhamento em torno da colônia, semelhante ao *Proteus*, mas em escala muito reduzida, cerca de 2 a 4 mm de diâmetro. A espécie *haemolytica* apresenta hemólise discreta, e a espécie *ochracea* tem cheiro de amêndoas.

IDENTIFICAÇÃO

Capnocytophaga de origem humana são oxidase e catalase negativas, produzem ácido a partir da glicose em caldo enriquecido com soro de coelho e inóculo denso. Motilidade negativa; indol negativo; lisina, ornitina e arginina negativas. A maioria é esculina positiva (*gingivalis* é variável e *granulosa* negativa). A diferenciação das espécies é difícil. As amostras de origem animal (*C. canimorsus* e *cynodegmi*) são oxidase, catalase e arginina positivas.

EIKENELLA

Também é bactéria da microbiota da cavidade oral humana e atribue-se participação em infecções periodontais, sendo encontrada na placa bacteriana subgengival em adultos com periodontite. Isolada em material de trato respiratório inferior, abscessos de partes moles, sangue e fluídos estéreis infectados em casos de infecções pleuronegumonares, infecções pósnequirgicas de parede, artrite, meningite, endocardite e septicemia.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

É anaeróbio facultativo, mas cresce melhor com 5% de CO₂, em ágar sangue e chocolate, mas não em Mac Conkey. O crescimento é lento, necessitando de 2 a 4 dias para boa visualização das colônias. Em cerca da metade das cepas pode-se observar a corrosão do ágar, que é sua característica marcante. Produz um pigmento amarelo claro e tem odor de hipoclorito no ágar sangue e ágar chocolate.

Na bacterioscopia são observados bacilos delgados ou coco-bacilos gram negativos com extremidades arredondadas. E, bioquimicamente, caracteriza-se por ser oxidase positiva, catalase negativa, motilidade negativa e ornitina positiva; provas negativas de utilização de carboidratos, uréia, indol e esculina.

KINGELLA

Espécies de *Kingella* fazem parte do trato respiratório e genito-urinário humanos. *K. kingae* é a espécie mais importante e é um patógeno oportunista responsável por casos graves de endocardite, osteomielite, septicemia, com provável porta de entrada em lesões da mucosa da orofaringe. A doença valvular pode estar ou não associada a doença cardíaca prévia. A osteomielite ocorre com

maior frequência em crianças menores de 5 anos. Os quadros sépticos podem ser semelhantes à doença meningocócica.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

A *K. kingae* cresce em ágar sangue e ágar chocolate com 5% de CO₂, após pelo menos 48 h de incubação, mas não em Mac Conkey. Tem como característica ser beta-hemolítica no ágar sangue de carneiro, mas sem hemólise intensa. Pode crescer numa mesma placa de isolamento como colônias lisas e convexas ou fazendo corrosão, ou colônias espalhadas como se fossem móveis.

São coco-bacilos que ocorrem aos pares ou cadeias curtas, podendo ser confundida com *Neisseria* spp. e, bioquimicamente, são oxidase positiva, motilidade e catalase negativas, e acidificam a glicose lentamente.

Provas diferenciais entre os fastidiosos oxidase positivas e catalase negativas: Fastidiosos oxidase positivas e catalase, uréia e esculina negativas

Bactérias	Hemólise	Indol	Ornitina	Glicose
<i>C. hominis</i>	neg	+	neg	+
<i>E. corrodens</i>	neg	neg	+	neg
<i>K. kingae</i>	+	neg	neg	+

CARDIOBACTERIUM HOMINIS

Cardiobacterium é flora do trato respiratório humano e ocasionalmente do trato urogenital. Está associado quase exclusivamente a quadros de endocardite, precedidos de manipulação dentária.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

Cresce em 3 a 5 dias em hemoculturas, mas não causa alterações no meio (turvação, hemólise, película, grumos, etc.). Cresce em 3 a 5 dias em 5 a 7% de CO₂, em ágar sangue e ágar chocolate, mas não em Mac Conkey. As colônias são branco-amareladas e podem manifestar um pequeno espriamento da colônia simulando motilidade no ágar como o *Proteus* e eventualmente a corrosão do ágar.

São bacilos Gram negativos, podendo apresentar pleomorfismo com extremidades dilatadas como bulbos que podem reter corante violeta e com arranjos característicos em agrupamentos de rosetas e formas isoladas como gota d'água ou alteres. Deve-se observar estas características para não confundir com bacilos Gram positivos.

Uma prova fundamental é a produção de indol, que deve ser feita em caldo triptona, com inóculo denso, incubação de 48 h, e extração com xilol e uso do reagente de Ehrlich.

CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM

Encontrada na natureza no solo e na água, a infecção em geral está relacionada a lesões cutâneas com estes elementos. Lesões localizadas ou formas septicêmicas graves com múltiplos abscessos têm sido esporadicamente relatadas. Mais raramente diarreia e infecção urinária.

CULTIVO E BACTERIOSCOPIA

Bacilo Gram negativo anaeróbio facultativo, reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondadas, isolados ou em arranjos aos pares ou em cadeias curtas.

Diferente da maioria dos fastidiosos, cresce além do ágar sangue e chocolate, também em Mac Conkey. Característica de colônia convexa, lisa e de cor violeta forte, embora algumas variantes sem cor possam ocorrer. Algumas cepas podem ser levemente hemolíticas no ágar sangue.

STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS

Encontrado na nasofaringe e orofaringe de ratos, camundongos e outros roedores domésticos como a cobaia. As infecções estão relacionadas a mordida destes roedores ou ingestão de leite ou alimentos contaminados. A febre por mordedura do rato apresenta quadro clínico bem definido com período de incubação de cerca de 10 dias, início abrupto com febre elevada, tremores, cefaléia intensa, vômitos e artralgia migratória.

Rash semelhante ao sarampo com erupções maculopapulares podendo ser pustulosa, com petéquias ou púrpuras nas extremidades, incluindo região palmar e plantar. Complicações graves podem ocorrer como endocardite, pericardite, septicemia, abscesso cerebral, etc. Sem tratamento pode evoluir favoravelmente em 2 semanas ou pode se tornar crônica; a mortalidade chega a 10%.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

É um bacilo Gram negativo muito pleomórfico, podendo ter em culturas mais velhas de 1 a 150 µm de comprimento (habitualmente bactérias tem de 1 a 3 µm), com eventuais dilatações como um colar de pérolas, sem apresentar ramificações, quebrando em formas coco-bacilares. Em culturas jovens pode ter morfologia mais uniforme. O isolamento é feito de hemocultura, aspirado de derrames (devem ser centrifugados para concentrá-los) e abscessos.

Meios de cultivo

- Colher sangue para hemocultura com citrato. Não se deve usar hemoculturas com SPS que é inibidor do *S. moniliformis*.
- Cultivar em meio bifásico TSA/TSB ou ágar infusão coração ou caldo infusão coração, suplementados com 10% de soro de cavalo ou 15% de soro de coelho, e 0,5% de extrato de levedura.
- Incubar em jarra de anaerobiose ou 10% CO₂ a 35-36°C e umidade.

Após cerca de três dias crescem colônias cinzas de 1-2 mm de diâmetro, consistência butirosa podendo surgir colônias variantes com aparência de ovo frito como micoplasmas. Em caldo de cultura crescem em 2 a 3 dias com aparência de bolas de pêlo.

As provas bioquímicas exigem a adição de soro de cavalo ou coelho para suportar o crescimento. São oxidase, catalase, indol e uréia negativos; e positivos para esculina, H₂S com a prova da tira de acetato de chumbo e hidrólise da arginina. Acidificam lentamente a glicose em base CTA com 0,5% de soro de cavalo.

8. BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS

INTRODUÇÃO

Existe um grupo de bactérias, que produz patologia no ser humano, e que não tem capacidade de multiplicar-se em presença do oxigênio atmosférico. E mais, para muitas espécies destas bactérias o oxigênio é deletério. Estas bactérias são chamadas de anaeróbios estritos, para diferenciá-las dos chamados anaeróbios facultativos, que têm a capacidade de desenvolver seus processos metabólicos, tanto em presença como na ausência do oxigênio. A maior parte das bactérias patogênicas do ser humano são anaeróbios facultativos e as famílias *Micrococaceae*, *Streptococaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, são exemplos destes microrganismos.

Os anaeróbios estritos estão constituídos por numerosas famílias, gêneros e espécies com caracteres morfológicos como H_2O_2 que se formam em presença de oxigênio e que podem ser tóxicos, bioquímicos e antigênicos muito diferentes. São estudados em capítulo separado porque a metodologia para seu isolamento e identificação laboratorial é própria deste grupo, e porque produzem alguns tipos especiais de processos patológicos no ser humano.

Existem várias teorias que tentam explicar esta susceptibilidade dos anaeróbios estritos ao oxigênio. Entre elas, as seguintes:

- Oxigênio seria um tóxico direto para a bactéria anaeróbia.
- As bactérias anaeróbias estritas não têm a enzima catalase que impede a formação de grandes quantidades de peróxidos.
- Oxigênio altera enzimas bacterianas importantes no metabolismo (oxida, por exemplo, enzimas que contêm sh).
- As bactérias anaeróbias estritas não possuem a enzima superóxido dismutase, capaz de transformar o radical, o que é altamente tóxico para a bactéria.

Existem vários argumentos a favor ou contra estas teorias. Provavelmente mais de um destes fatores seja importante para explicar a ação deletéria do oxigênio nestas bactérias.

Esta labilidade dos anaeróbios estritos ao oxigênio explica a dificuldade existente nos laboratórios para seu isolamento e estudo. Por este motivo também, boa parte das infecções provocadas por estes microrganismos não eram diagnosticadas até a década de 1970, quando foram desenvolvidos procedimentos práticos de laboratórios para criar atmosferas de anaerobiose. Assim, as infecções provocadas pelos microrganismos mais resistentes dentro deste grupo, os esporulados do gênero *Clostridium*, eram diagnosticadas com maior frequência. Hoje sabemos que as infecções por *Clostridium* são menos frequentes que as infecções provocadas por outros gêneros de bactérias anaeróbias.

Um fato que também merece ser destacado, para explicar a frequência com que estas bactérias provocam infecção, é que os anaeróbios estritos são habitantes normais do organismo humano, ultrapassando em número os aeróbios e anaeróbios facultativos. Assim, os anaeróbios estritos estão em proporções 5 a 1000 vezes maiores que os anaeróbios facultativos na microbiota normal do tubo digestivo, pele, trato respiratório superior e genital feminino.

Quando existem fatores predisponentes estas bactérias provocam processos patológicos em diferentes órgãos e sistemas. Por este motivo, a maior parte das infecções provocadas pelas bactérias anaeróbias estritas são infecções chamadas endógenas. É a própria microbiota bacteriana do doente que em determinado momento provoca o processo infeccioso, sendo este tipo de infecção pouco ou não contagioso. As infecções provocadas pelo gênero *Clostridium* são fundamentalmente adquiridas a partir do meio ambiente externo e por este motivo são chamadas de infecções exógenas.

Nas mucosas, onde os anaeróbios estritos formam parte da flora normal, existem condições locais de anaerobiose. Estas condições são provocadas por compostos orgânicos, enzimas, restos celulares e bactérias anaeróbias facultativas que baixam o potencial redox nestes locais. Neste sentido devemos assinalar que estas bactérias toleram pequenas quantidades de oxigênio. As mais estritas crescem em atmosferas com 0,5% de oxigênio, muitas crescem em atmosferas ao redor de 3% e algumas podem crescer ainda em concentrações de até 8% de oxigênio.

Como as bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias favorecem a multiplicação dos anaeróbios, por consumirem o oxigênio existente no local e talvez por produzirem alguns fatores de crescimento como substâncias secundárias do seu metabolismo, a maior parte das infecções por bactérias anaeróbias estritas são infecções mistas. Assim, são frequentes as infecções conjuntas com Enterobactérias, *Pseudomonas* e *Staphylococcus aureus*.

Alguns aspectos clínicos fazem suspeitar uma infecção com envolvimento de bactérias anaeróbias, sendo os principais estes abaixo relacionados:

- Secreção fétida
- Infecção nas proximidades de superfície mucosa
- Tecido necrótico
- Presença de gás em tecidos ou secreções
- Tromboflebite séptica
- Coloração negra em secreção com sangue
- Infecção decorrente de mordida humana ou de animal
- Presença de grânulos de enxofre nas secreções
- Terapêutica prévia com aminoglicosídeos
- Gangrena gasosa

Uma lesão com aspecto de um micetoma e a observação de grânulos de enxofre no pus obtido são característica de uma infecção por *Actinomyces*. A infecção por anaeróbios secundária a uma mordida de animal ou do ser humano é explicada pela existência de um grande número destas bactérias na cavidade oral destes hospedeiros. Associados a estes elementos clínicos, existem alguns outros, laboratoriais, que sedimentam ainda mais a suspeita de uma infecção por anaeróbios estritos:

- Ocorrência de formas pleomórficas na coloração de Gram (como regra geral, os anaeróbios são mais pleomórficos que os aeróbios e anaeróbios facultativos).
- Observação no material, de bacilos gram positivos esporulados que fazem pensar em *Clostridium*.
- Presença de bactérias no Gram direto, que não crescem nos meios mantidos em atmosferas de aerobiose.
- Crescimento de bactérias somente na parte inferior de tubos com meios de cultura líquido ou semi-sólido.

FATORES PREDISPONETES

Uma variedade de condições predispõe um indivíduo a desenvolver infecção por anaeróbios. Podemos generalizar dizendo que todos os fatores que fazem diminuir a quantidade de oxigênio nos tecidos, e, portanto, o potencial de oxi-redução dos mesmos, favorecem a infecção por anaeróbios estritos. Entre estes fatores podemos assinalar como mais frequentes os seguintes:

- Diminuição do fluxo sanguíneo.
- Presença de áreas necróticas.
- Corpos estranhos.
- Acúmulo de sais endógenos (por exemplo, pontos de calcificação).
- Infecção por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas.
- Manipulações cirúrgicas.
- Esterilização intestinal pré-operatória.
- Tumores, processos orgânicos ou caseosos.

Um baixo potencial de oxi-redução facilita o crescimento de bactérias anaeróbias e a causa clínica mais comum de diminuição do potencial redox é a anóxia dos tecidos resultante de lesão vascular, compressão, hipotermia, choque, edema e outras condições levando à má perfusão.

Quanto às doenças sistêmicas ou condições gerais como corticoterapia, terapêutica de tumores, leucopenia, hipergamaglobulinemia, colagenoses, diabetes, esplenectomias, embora relacionadas

como predisponentes, não há evidência concreta de que realmente estejam associadas à maior incidência de infecção por anaeróbios.

COLETA DE MATERIAL

As amostras devem ser colhidas de forma que não entrem em contato com oxigênio e não se contaminem com bactérias anaeróbias da flora normal. Por este motivo devem ser aspiradas com seringa, da qual é eliminado o ar imediatamente após a obtenção da amostra.

O material não pode ser colhido com zaragatoa (swab). Para evitar a contaminação pelos anaeróbios da flora normal, não devem ser semeados escarro, secreção faríngea ou nasal, secreções vaginais, fezes ou material de colostomia, pois estes materiais sempre têm bactérias anaeróbias. Idealmente, as bactérias anaeróbias estritas são pesquisadas em líquidos aspirados de cavidades fechadas, material obtido por aspiração profunda de feridas, punção de traquéia ou pulmonar e sangue para hemocultura.

Em resumo, serve qualquer material que não esteja normalmente contaminado com as bactérias anaeróbias da flora normal.

TRANSPORTE DO MATERIAL

O transporte pode ser feito com a mesma seringa com que foi colhido o material. Obviamente que este transporte deve ser o mais rápido possível. O melhor é que a mesmo profissional que colheu leve imediatamente a seringa ao laboratório.

Também pode ser empregado, com este fim, um vidro do tipo de penicilina, que contém meio de tioglicolato de sódio (± 7 ml). O tioglicolato é um sal redutor, de forma que no interior do meio existem condições de anaerobiose. A este meio líquido pode acrescentar uma pequena quantidade de ágar (0,5%) para transformá-lo em um meio mais espesso, o que dificulta a difusão de oxigênio. O meio tem um indicador de oxigenação que é a rezarsurina, de modo que se por algum motivo existe oxigenação do mesmo, o indicador adquire cor rosa.

O material aspirado é inoculado no interior do meio de cultura, através da tampa de borracha. Especial cuidado deve ter-se para não agitar o meio, antes e depois da inoculação, para evitar sua oxigenação.

As amostras colhidas neste meio podem ser encaminhadas ao laboratório várias horas após sua inoculação (até 24 horas).

PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Sempre é feita uma coloração de Gram e de esporos, quando necessário, da amostra recebida, o que pode orientar o clínico para o diagnóstico e a terapêutica precoce. Por exemplo, a observação num processo com aspecto de gangrena gasosa de bacilos gram positivos, grandes esporulados, é quase confirmação do diagnóstico de *Clostridium* e de gangrena gasosa.

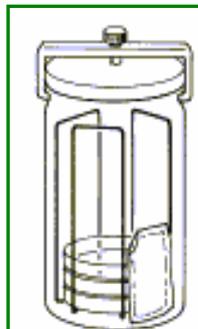
A existência de poucas ou muitas bactérias na amostra permite orientar o bacteriologista se ele deve enriquecer previamente a amostra em um caldo ou fazer diretamente a semeadura em placa. Quando o material vem numa seringa, a semeadura é feita em tioglicolato e em placa. Quando o material já vem no meio de tioglicolato, é feita, a partir deste, a semeadura em placa, e incubados ambos os meios.

PRODUÇÃO DE ANAEROBIOSE

Existem vários procedimentos para conseguir no laboratório uma atmosfera de anaerobiose adequada à multiplicação das bactérias anaeróbias produtoras de patologia no ser humano. Por exemplo:

- Uso de tubos com meios sólidos pré-reduzidos.

- Câmaras anaeróbias (glove box), nas quais o manipulador introduz somente as mãos, sendo o ar eliminado, colocando-se uma mistura de gases (H_2 , CO_2 , N_2); nestas câmaras existem todos os elementos necessários para o trabalho bacteriológico, incluindo estufas de incubação.
- Sistema mais empregado é o sistema das jarras de anaerobiose com geradores químicos que permitem obter uma atmosfera adequada para a multiplicação destas bactérias. Existem diversos tipos de geradores. Os mais utilizados são os que provocam um consumo do oxigênio com substâncias redutoras como ferro reduzido ou ácido ascórbico.



Dentro da jarra é colocado, além dos geradores químicos, uma fita de papel filtro impregnada de azul de metileno, que é um indicador de anaerobiose. Quando a atmosfera do interior da jarra tem condições adequadas de anaerobiose, o azul de metileno altera para uma cor branca.

Numa jarra de tamanho médio 2,5 litros, coloca-se aproximadamente 10 placas e muitos tubos. Com estes sistemas o conteúdo de O_2 da jarra cai a 0,4%, em aproximadamente 1 hora e meia, de forma que as condições anaeróbias estão presentes bem antes da transformação do azul de metileno, que acontece por volta de 4-6 horas.

Observar uma jarra com placas semeadas, um gerador de anaerobiose sobre a última placa, e o indicador de anaerobiose reduzido de cor branca. Comparar esta cor com a cor azul do indicador nos geradores localizados fora da jarra em sua parte inferior.

Os métodos citados acima dão resultados semelhantes quanto à eficácia do isolamento de bactérias anaeróbias em amostras clínicas, porém, o sistema das jarras é o mais prático e menos complicado.

SEMEADURA EM PLACA

As amostras são semeadas em três placas de ágar sangue preparadas com ágar *Brucella*, adicionadas com 10% de sangue de carneiro. Uma das placas é incubada a 37°C em atmosfera aeróbia, e uma segunda é incubada a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO_2 para bactérias microaerófilas. Para este fim colocamos a placa em uma jarra com um gerador de CO_2 , produzindo aproximadamente 5% de CO_2 . A terceira placa é a que se inocula em atmosfera de anaerobiose. O meio de cultura desta terceira placa é enriquecido com hemina (5mg/ml), vitamina K (10 mg/ml) e extrato de levedura (0,5%). Neste meio acrescenta-se também um antibiótico aminoglicosídeo (geralmente amicacina, 100 mcg/ml).

A adição do antibiótico cria um meio seletivo porque os anaeróbios estritos são resistentes a estes antimicrobianos e a maior parte das cepas de aeróbios e anaeróbios facultativos é sensível. Como a maior parte das infecções provocadas pelos anaeróbios estritos são infecções mistas, este meio seletivo ajuda o isolamento bacteriano. Não se justifica o uso de mais uma placa sem antibiótico porque aumentam os custos sem aumentar o isolamento de anaeróbios.

Estas placas são incubadas dentro da jarra a 37°C de temperatura durante 48 horas. Quando se suspeita, pelo quadro clínico ou pela coloração de Gram da amostra, que estamos em presença de uma infecção por *Clostridium*, que são de crescimento mais rápido, as jarras podem ser abertas após 18 a 24 horas de incubação.

Por outro lado, bactérias de crescimento mais lento, como os actinomices, podem demorar sete dias ou mais para formar colônias visíveis.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

COMPROVAÇÃO DE ANAEROBIOSE ESTRITA

Após a incubação, as placas são examinadas e agora o passo mais importante é a comprovação de que as bactérias desenvolvidas nas placas de anaerobiose são anaeróbios estritos.

Para este fim, são feitas colorações de Gram, de todos os diferentes tipos de colônias observadas nas três placas e comparada a morfologia bacteriana. Ao mesmo tempo, semea-se as diversas bactérias obtidas, novamente em anaerobiose e aerobiose.

Só é feito o diagnóstico de anaeróbio estrito quando, após 24 a 48 horas da nova incubação, a bactéria apenas crescer na placa de anaerobiose. O Gram das colônias já orienta para uma identificação preliminar do grupo de anaeróbio isolado.

Agrupamento das bactérias anaeróbias estritas, de importância em patologia humana de acordo com sua morfologia na coloração de Gram

Cocos Gram positivos	<i>Staphylococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Cocos Gram negativos	<i>Veillonella</i> <i>Acidaminococcus</i> <i>Megasphaera</i>
Bacilos Gram positivos não esporulados	<i>Propionibacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Lactobacillus</i>	Bacilos Gram positivos esporulados	<i>Clostridium</i>
Bacilos Gram negativos	<i>Bacteróides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i>		

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PRESUNTIVA

Das colônias de anaeróbios estritos, deve ser feita coloração de Gram. Já nesta etapa o laboratório presta uma grande ajuda ao clínico, informando que o paciente tem uma infecção por uma bactéria anaeróbia estrita que pertence a determinado grupo morfológico.

O diagnóstico de gênero e espécie é feito utilizando:

- Provas bioquímicas: utilização de açúcares, produção de indol, redução de nitratos, urease, crescimento em presença de bile, liquefação da gelatina, hidrólise de esculina etc.
- Produção de pigmentos
- Hemólise
- Aprofundamento no ágar
- Susceptibilidade a antimicrobianos
- Formação de ácidos detectados por cromatografia líquida
- Inoculação experimental
- Sorologia

As seguintes considerações práticas são úteis para a orientação do clínico para uma conduta adequada, sem a necessidade de aparelhos ou metodologias caras por parte do laboratório:

- Na presença de cocos Gram positivos, o laboratório deve fazer o diagnóstico presuntivo de *Peptostreptococcus* que são os mais freqüentemente isolados neste grupo morfológico.
- Diagnóstico diferencial com *Streptococcus* e *Staphylococcus* anaeróbios como das espécies de *Peptostreptococcus* deve ser feita com ajuda da cromatografia para detectar a produção de diferentes ácidos graxos.
- Na presença de cocos Gram negativos, o laboratório deve fazer o diagnóstico presuntivo de *Veillonella*, gênero mais freqüente neste grupo. Para o diagnóstico diferencial com os outros gêneros de cocos Gram negativos também é recomendada a cromatografia líquida, para pesquisar ácidos graxos.
- Na presença de bacilos Gram positivos esporulados, o laboratório deve fazer o diagnóstico de *Clostridium*.
- Na dúvida no diagnóstico de bacilo esporulado, recomenda-se o tratamento com álcool etílico a 95%, durante 1 hora à temperatura ambiente e ressemeadura posterior. Além disso, a suspensão bacteriana pode ser aquecida a 80°C durante 10 minutos, esfriada e feita ressemeadura. Após um ou outro destes procedimentos, só sobrevivem bactérias esporuladas.
- Se o *Clostridium* produzir um duplo halo de hemólise pode ser feito o diagnóstico presuntivo de *Clostridium perfringens*. Esta espécie é a mais freqüentemente isolada dentro deste grupo bacteriano.

- Para o diagnóstico diferencial das outras espécies de *Clostridium* devem ser feitas provas bioquímicas como hidrólise da gelatina, fermentação da glicose, lecitinase, lipase, produção de indol, uréia, nitratos, e motilidade.
- Na presença de bacilos Gram positivos não esporulados recomendamos fazer a prova de catalase, redução de nitratos, hidrólise de esculina, urease, e produção de pigmento. Para o diagnóstico definitivo, deve ser feita a pesquisa da produção de ácidos graxos.
- Se a coloração de Gram mostrar bacilos Gram negativos, recomendamos semear a colônia em ágar sangue (Brucella ágar), colocando um disco de Rifampicina (15 mcg) e um disco de Kanamicina (1.000 mcg); a bactéria deve também ser semeada num meio que contém bile a 20%, e num meio rico em triptofano para determinar a produção de indol, com as placas incubadas por 48 horas a 37°C.
- Estas provas junto com a produção de pigmento permitem fazer o diagnóstico presuntivo de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.
- Frente aos discos de antibióticos, a bactéria é considerada sensível se o halo de inibição é de 12 mm ou maior; considerada resistente com halos menores de 12 mm.
- Como inóculo para a semeadura utiliza-se uma suspensão com turvação semelhante ao número 3 de escala de MC Farland ou uma turvação semelhante após incubação em meio de tioglicolato.
- A prova da bile é considerada positiva, se existir crescimento bacteriano no quadrante respectivo. Para a produção de pigmento, recomendamos a observação direta das colônias, e, em caso de não existir pigmento evidente, iluminar a placa com luz ultravioleta (± 360 nm de comprimento de onda). Colônias de *Prevotella melaninogenicus* aparecem de cor tijolo avermelhado.
- Para a prova de indol, recomendamos passar uma colônia, a partir do meio com triptofano, com ajuda de uma alça de platina num papel filtro impregnado em 1% de paradimetilaminocinamaldeído (em ácido clorídrico 10%). Uma reação positiva produz imediatamente uma cor azul.

O diagnóstico presuntivo é feito de acordo à seguinte tabela:

Bacilos Gram negativos anaeróbios estritos

Bactérias	Rifampicin a 15 mcg	Kanamicin a 1.000 mcg	Bile 20%	Indol	Pigmento
<i>Bacteroides grupo fragilis</i>	sensível	resistente	+	+/-neg	neg
<i>Prevotella sp</i>	sensível	resistente	neg	+/-neg	+
<i>Porphyromonas sp</i>	sensível	resistente	neg	+	+
<i>Bacteróides sp</i>	sensível	sensível-resistente	neg	neg	neg
<i>F.mortiferum</i>	resistente	sensível	+	neg	neg
<i>F.varium</i>	resistente	sensível	+	+	neg
<i>Fusobacterium spp.</i>	sensível	sensível	neg	+	neg

Para Rifampicina e Kanamicina:

Sensível = halo de inibição com 12 mm ou mais de diâmetro

Resistente = ausência de halo ou menor que 12 mm de diâmetro.

- A diferenciação dos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas* é realizada através da capacidade de fermentar glicose que é positiva para o primeiro gênero e negativa para o segundo.
- Alguns sistemas comerciais manuais ou automatizados permitem fazer o diagnóstico das diferentes espécies de anaeróbios utilizando numerosas provas bioquímicas.
- Alguns utilizando a ação de enzimas bacterianas pré-formadas podem fazer este diagnóstico após 4 horas de incubação. Destes os mais freqüentemente utilizados são:
 - API®, Vitek® e Microscan®. Estes sistemas mais caros não são fundamentais para o diagnóstico dos grupos bacterianos e para uma orientação terapêutica adequada.

- Em algumas infecções é importante, para o diagnóstico, determinar a presença de toxinas como acontece nas infecções intestinais por *Clostridium difficile*. Esta determinação é feita com provas sorológicas disponíveis comercialmente.

PROVAS DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O estudo da sensibilidade destas bactérias é importante pelo aumento permanente de sua resistência frente aos diferentes antimicrobianos. Esta resistência é mais comum nos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, mas pode estar presente também nos gêneros *Clostridium*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

Método do Disco

O método do disco difusão não é adequado para estudar a sensibilidade das bactérias anaeróbias estritas. O NCCLS (National Committee for Clinical Laboratories Standards) dos EUA recomenda um método de diluição em ágar: as concentrações de antimicrobianos são incorporadas no meio de Wilkins-Chalgren. Cada placa tem uma concentração de um antimicrobiano. As bactérias são semeadas utilizando o inoculador múltiplo de "Steers" e as placas colocadas em jarras com gerador de anaerobiose. A leitura é feita após 48 horas de incubação na estufa, determinando-se a CIM (concentração inibitória mínima).

Método da Fita

Um método alternativo mais prático é a determinação da sensibilidade utilizando fitas de plástico impregnadas com um gradiente de concentração de antimicrobianos como no método do E test®. As bactérias são semeadas em forma similar à empregada no método do disco para aeróbios. São colocadas duas fitas cada uma com um antibiótico diferente em cada placa de 9 cm de diâmetro. Em geral é necessário testar 6 antibióticos (3 placas). Os antimicrobianos com maior atividade *in vitro* e *in vivo* frente aos anaeróbios estritos são: cloranfenicol, clindamicina, cefoxitina, metronidazol, penicilina e amoxicilinanegácido clavulânico. As placas são incubadas dentro de jarra com gerador a 37 graus de temperatura. A leitura é feita após 48 horas de incubação, e a sensibilidade é interpretada nos dois métodos seguindo as tabelas publicadas pelo NCCLS.

Salientamos que existe uma boa correlação nos resultados obtidos com as duas metodologias descritas.

9. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS E LAUDOS

INTRODUÇÃO

O microbiologista ao elaborar os relatórios de exames microbiológicos deve ter em mente a possibilidade do clínico não saber interpretá-lo adequadamente, tanto por desconhecer um determinado nome de bactéria, como seu potencial patogênico e porque muitas vezes estas dúvidas associadas à disponibilidade do antibiograma possam ser um fator determinante do uso inadequado de antimicrobianos.

Cabe ao microbiologista elaborar um laudo claro e objetivo, facilitando a comunicação:

- Diretamente (telefone ou pessoalmente), indo ao encontro do clínico ou encorajando-o a procurar o laboratório para discutir casos ou participar de reuniões, visitas de enfermaria, etc.
- Elaborando manuais de coleta, informes sobre perfil de bactérias mais isoladas e padrões de sensibilidade (por exemplo em hemoculturas, em urina, ferida cirúrgica por especialidade, etc.).
- Esclarecendo novos padrões de relatórios, novos agentes, seu potencial patogênico, mudanças de padrões (p. Ex. de antibiograma), disponibilidade de recursos diagnóstico e orientação terapêutica (ex. E-test, testes rápidos com látex para pesquisa de antígenos, etc.).

Microbiologista deve ter em mente os principais agentes etiológicos correspondentes a cada material enviado, bem como da respectiva flora normal, para adequada interpretação do resultado.

Cabe ao microbiologista como membro nato da Comissão de controle de infecção hospitalar:

- Tomar iniciativa de procurar o médico ou o paciente para esclarecer dúvidas sobre exames e materiais.
- Estimular e envolver a enfermeira e o infectologista da CCIH ou clínico para a comunicação rápida dos resultados de bactérias resistentes, dos exames relacionados com diagnóstico de infecção hospitalar, dos exames de urgência como de LCR, hemocultura, etc., do diagnóstico de doenças de notificação compulsória ou que exijam isolamento, etc.

Em resumo, mais do que um retrato do crescimento nas placas de Petri, o laudo microbiológico deve ser o resultado de uma leitura interpretativa e crítica utilizado como um instrumento de comunicação e interação entre o laboratório de microbiologia e o médico.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O microbiologista na sua rotina diária para decidir a importância das bactérias ou fungos isolados deve considerar o potencial patogênico do agente, a bacterioscopia e o pedido médico.

Bactérias como *S. pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycobacterium tuberculosis*, independente do material que foram isoladas são de importância clínica e epidemiológica. Bactérias como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, se forem isolado no LCR ou sangue são de importância indiscutível, mas quando isolados em mucosas costumam representar flora e seu relato é discutível.

ALGUMAS SUGESTÕES IMPORTANTES

Como norma, não se deve identificar e fazer antibiograma de bactérias da microbiota de pele e mucosas. No entanto, é sempre conveniente entender as sugestões que se seguem como sujeitas a revisões conceituais e atualizações:

- Conversar com o médico do paciente ou com o médico da CCIH ou mesmo com o paciente se indicado.
- Quando não for possível a comunicação, relatar os achados da bacterioscopia, se realizada, com identificação sumária (bacilos ou coco-bacilos não fermentadores), ou ao nível de gênero (enterobactérias e alguns Gram positivos), se o estafilococo é *aureus* ou coagulase negativo, etc.
- Conservar a bactéria por um prazo de 7 a 10 dias deixando a possibilidade de prosseguir nos testes caso necessário.

- Estudos quantitativos são sempre que possível mais úteis que exames qualitativos, usando ou diluição do material ou semeando com alça calibrada
- Relatório quantitativo de bacterioscopia: número médio de bactérias anotadas no mínimo em 10 campos observados.
- Relatório qualitativo de bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram, descrevendo e quantificando a presença de:
 - grupos morfológicos de bactérias (cocos/bacilos/ Gram positivos ou negativos) e predomínio; quando o microbiologista for experiente recomenda-se adicionar o comentário "sugestivo de pneumococo ou *haemophilus*", etc.
 - bactérias intracelulares (neutrófilos ou fagócitos)
 - fungos leveduriformes em brotamento e hifas, etc.
- Finalmente a discussão sobre os materiais provenientes de tecido cutâneo-mucosos, o que devemos relatar com antibiograma e o que entender como flora são muito relativos, não havendo unanimidade para padrões definitivos de relatórios.

É sempre conveniente entender que as sugestões que se seguem estão sujeitas a revisões conceituais, atualizações e pequenas adaptações locais.

Como microbiologia é uma soma de evidências (microbiológicas, clínicas, epidemiológicas), torna-se impossível esgotar todas as possibilidades. O que pode e deve ser feito é buscar traçar linhas mestras para a orientação do raciocínio, deixando que cada caso seja analisado como um exercício constante do bom senso e cientificamente embasado.

Relatório quantitativo de exame microscópico pela coloração de Gram

Descritivo	Classificação numérica	Nr. médio de bactérias, células epiteliais, leveduras, neutrófilos /campo 1.000x
Ausente	0	0
Raros	+	1-5
Frequentes	++	6-15
Numerosos	+++	16-30
Incontáveis	++++	>30

LAUDO PARA O TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

OROFARINGE

É importante relatar os achados de bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram, descrevendo e quantificando a presença de:

- Células epiteliais
- Polimorfonucleares (neutrófilos) e/ou mononucleares (linfócitos)
- Principais grupos morfológicos de bactérias
- Presença de bactérias intracelulares (neutrófilos ou fagócitos)
- Presença de fungos leveduriformes / hifas
- Associação fuso-espirilar, quando presente

Patógenos a serem relatados em isolados de cultura:

- *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico do grupo A)
- *Arcanobacterium haemolyticum*
- *Bordetella pertussis*
- *Corynebacterium diphtheriae*

No caso da *Corynebacterium diphtheriae* quando solicitado, realizar ou encaminhar para Laboratório de Referência:

- Resultado sem patógenos: "Presença de bactérias da microbiota da orofaringe"
- No caso de paciente imunossuprimido, quando solicitado, cultura de vigilância e se houver predominância de bactéria ou fungo, relatar predomínio de: *P. aeruginosa*, *Candida* spp., *S. aureus*, *Enterococcus* spp., etc.; nestes casos o antibiograma será feito apenas quando solicitado pela CCIH.

Obs: Embora seja um tema polêmico na literatura e na prática microbiológica, relatar o isolamento de pneumococo, *Haemophilus*, *N. meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* em orofaringe, nos casos em que:

- a bacterioscopia revelar predomínio de neutrófilos (ressalva em imunossuprimidos), presença do agente em neutrófilos/macrófagos e crescimento abundante (nítido predomínio) em relação ao restante da microbiota.
- a pedido médico, colocar a seguinte observação: "A(s) bactéria(s) isolada(s) fazem parte da microbiota da orofaringe, não sendo recomendável uso de antimicrobianos. Consultar infectologista para orientação."

SWAB NASAL

O swab nasal ou de nasofaringe não tem valor diagnóstico para sinusite, otite ou infecções do trato respiratório inferior, não devendo ser processada para estes fins. Pode ser útil apenas para pesquisar portadores de *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico do grupo A).

EPIGLOTE/NASOFARINGE

No caso de epiglote, no material de nasofaringe ou do local, podem ser isolados o *Haemophilus influenzae*, o pneumococo e o *Streptococcus pyogenes* e mais raramente o *S. aureus* como agente etiológico. No caso de coqueluche deve-se pesquisar a *Bordetella pertussis*.

Relatar o resultado positivo ou negativo para *Haemophilus influenzae*, pneumococo, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Bordetella pertussis* quando pesquisados.

SEIOS DA FACE

Culturas de aspirados intra-operatórios ou obtidas por punção devem ser relatadas:

- Bacterioscopia - relato quantitativo de bactérias, fungos, neutrófilos e células epiteliais.
- Cultura dos agentes isolados e se houver predomínio de algum (são esperados o pneumococo, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes* e mais raramente o *S. aureus*).
- Caso seja sugestivo de contaminação com secreção de nasofaringe (muitas células epiteliais, poucos neutrófilos) relatar: "sugestivo de contaminação com microbiota de nasofaringe".
- É aconselhável em sinusite subaguda e crônica a cultura para anaeróbios. Quando realizada relatar o resultado. Quando não realizada, comparar a bacterioscopia com o resultado da cultura e relatar sobre a possibilidade de participação de bactérias anaeróbias (observadas no Gram, mas que não crescem em aerobiose).

A rino-sinusite infecciosa aguda e não complicada na maioria das vezes é de etiologia viral. Ressaltando-se os seguintes casos:

- Em imunossuprimidos e diabéticos valorizar o achado de fungos filamentosos do tipo *Aspergillus* spp.
- Em pacientes com entubação nasotraqueal ou nasogástrica > que 48h, o material pode revelar presença de enterobactérias, bactérias não fermentadoras, *S. aureus*, leveduras e polimicrobiana.

Devem ser relatados, mas para serem valorizados deve haver clínica ou evidência radiológica e material representativo.

OUVIDO

- **Otite externa:**
- relatar o resultado da bacterioscopia e fazer identificação e antibiograma caso a bacterioscopia de respaldo (abundantes neutrófilos e predomínio do tipo morfológico isolado na cultura de potencial patógeno) ao isolamento de uma enterobactéria ou *Pseudomonas* ou eventualmente fungo.

▪ **Otite média:**

- Culturas de materiais obtidos por timpanocentese (miringotomia) são ideais, mas raros e devem ser relatados os achados de bacterioscopia e cultura.
- Swabs, ou aspirados de conduto auditivo em membranas previamente rompidas tem pouco ou nenhum valor diagnóstico. Sugerir não coletar este tipo de material.
- Quando realizada a cultura, havendo crescimento de bactérias da microbiota (Gram positivos, Neisserias, enterobactérias, etc.) relatar: "presença de bactérias da flora do conduto externo".
- No caso da bacterioscopia revelar predomínio de um tipo morfológico, com abundantes neutrófilos e predomínio na cultura de um agente, relatar: microscopia do esfregaço corado pelo Gram com relatório quantitativo dos elementos celulares (células, bactérias e neutrófilos) e qualitativa.
- Resultado da cultura, quando o agente isolado for *Haemophilus*, *Pneumococo* ou *M. catarrhalis*, relatar o agente isolado e o antibiograma
- Quando o agente for uma enterobactéria ou *Pseudomonas* relatar que a bactéria isolada é sugestiva de contaminação, exceto se for em paciente com entubação nasotraqueal há mais de 48h. A pedido médico fazer antibiograma.
- No caso de mastoidite a indicação é obtenção cirúrgica de fragmentos ósseos para cultivo e não cultura de secreção de ouvido externo/médio. Poderá se relatado o cultivo deste material quando a bacterioscopia for concordante e a bactéria isolada for:
Aguda: *Haemophilus*, pneumococo, *S. pyogenes* e *S. aureus* – fazer antibiograma
Crônica: Enterobactérias, *Pseudomonas*, *S. aureus*.
- Quando isolar *Staphylococcus* coagulase negativa, *S. viridans*, Corynebactérias, etc, em flora mista, relatar: "presença de bactérias da flora do conduto auditivo externo" e não fazer antibiograma.

LAUDO PARA ESCARRO

O escarro é útil para diagnóstico de tuberculose e para os agentes de algumas micoses pulmonares (blastomicose sul-americana, histoplasmose, criptococose). Pode ser valorizado o agente isolado quando houver correspondência na bacterioscopia e quando houver poucas células epiteliais e numerosos leucócitos.

Quando a bacterioscopia revelar mais de 10 células epiteliais por campo de pequeno aumento (objetiva de 10x), havendo predomínio sobre leucócitos e sem um tipo morfológico predominante, relatar: "material com sugestiva contaminação de flora de orofaringe. Exame de valor diagnóstico prejudicado". Não processar o material e solicitar nova amostra.

Processar o material que revele menos de 10 células epiteliais, quando houver predomínio de leucócitos e predomínio de um tipo morfológico de bactéria. Este critério é mais rigoroso, pois o anterior, para mais de 25 células epiteliais, revelou ser mais fidedigno.

Os agentes bacterianos esperados em pneumonia aguda da comunidade são: *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae* e *S. aureus*.

LAUDO PARA SECREÇÃO ENDOTRAQUEAL, LAVADO TRAQUEAL, E LAVADO BRÔNQUICO

ROTINA PARA LAVADO BRÔNQUICO, ESCARRO E SECREÇÃO TRAQUEAL

- Homogeneizar muito bem a amostra, por pelo menos 1 minuto.
- Fluidificar as secreções traqueais muito espessas com 1,0 ml de solução salina estéril ou com N-acetil-cisteína.
- Pode-se também utilizar pérolas de vidro estéreis na homogeneização do material.
- Confeccionar lâmina para coloração de Gram.
- Centrifugar 7 ml e corar o sedimento, quando processar lavado brônquico.
- Corar o material direto, sem centrifugar, quando processar escarro e secreção traqueal.
- Fixar cuidadosamente o esfregaço seco sobre a chama.

- Observar ao Gram (imersão) a presença de bactérias intracelulares que devem ser reportadas caso ultrapassem 7%.
- Verificar a presença de células estratificadas epiteliais. Mais de 1 célula para cada 10 leucócitos ou mais de 10 células em campo de pequeno aumento contra indicam a realização de cultura, e portanto reportar como **Material Inadequado**.
- Confeccionar também lâminas para coloração de BAAR e pesquisa de fungos, quando necessário.
- Plaquear volume de 1 µl (alça calibrada) em meios de Mac Conkey, MN, Ágar Sangue e Ágar Chocolate (atmosfera CO₂).
- Incubar todas as placas por 24 horas a 35 + 1º C e realizar a primeira leitura quantitativa.
- Reincubar por mais 24 horas nos casos de difícil diferenciação macroscópica entre colônias.
- Multiplicar o número de cada tipo de colônia identificada pelo fator 10³.
- Interpretar como significativo as contagens > 10⁵ UFC do lavado brônquico, escarro ou secreção traqueal.
- Realizar antibiograma somente para as colônias com contagens significativas.
- Liberar apenas a identificação, sem TSA, para microrganismos em contagens inferiores a 10⁵ UFC.

RELATÓRIO

Quando usar técnica qualitativa:

- Quando o material for adequado, mas mais de três bactérias isoladas, sem predomínio, relatar microbiota mista, presença de (número) Gram positivos e (número) de Gram negativos. Não fazer antibiograma e guardar a placa por sete dias.
- Quando houver predomínio de uma bactéria relatar: predomínio do agente e antibiograma. Presença de outros microrganismos: Gram positivos e/ou Gram negativos, no máximo identificados a nível de gênero, sem antibiograma.

Quando usar técnica quantitativa:

- Se houver contagem significativa, com predomínio de um microrganismo e eventualmente 2, relatar o(s) agente(s) isolado(s) e fazer antibiograma.
- Se a contagem não for significativa ou várias bactérias da microbiota do trato respiratório superior foram isoladas relatar: "presença de bactérias da flora do trato respiratório superior sem valor diagnóstico". Não identificar nem fazer antibiograma.

LAUDO PARA LAVADO BROCOALVEOLAR OU ESCOVADO BRÔNQUICO

São considerados junto com a biópsia pulmonar os materiais de melhor valor preditivo de isolamento do agente patogênico. É imprescindível a semeadura quantitativa para posterior contagem do número de colônias.

ROTINA DE SEMEADURA E INTERPRETAÇÃO PARA ESCOVADO PROTEGIDO E BAL

- Passar assepticamente a escova para um tubo contendo 1,0ml de solução salina estéril.
- Homogeneizar muito bem em vórtex por pelo menos 1 minuto.
- Confeccionar lâmina para Gram com pipetor de 10 µl ou alça calibrada de mesmo volume.
- Deixar a lâmina secar por 30 minutos dentro da estufa.
- Completar a fixação do esfregaço cuidadosamente sobre a chama.
- Confeccionar também lâminas para coloração de BAAR e pesquisa de fungos, quando necessário.
- Plaquear 10 µl (alça calibrada ou pipetor) em Mac Conkey, MN, Ágar Sangue e Ágar Chocolate (CO₂).
- Plaquear 1 µl (alça calibrada) em Mac Conkey, MN, Ágar Sangue e Ágar Chocolate (CO₂)
- Incubar todas as placas por 24 horas a 35 + 1º C e realizar a primeira leitura quantitativa.

- Reincubar por mais 24 horas nos casos de difícil diferenciação macroscópica entre colônias.
- Multiplicar a contagem dos tipos de colônias identificadas pelo fator, de acordo com o volume plaqueado.
 - Multiplicar pelo fator 10^2 quando o volume plaqueado foi 10 μ l.
 - Multiplicar pelo fator 10^3 quando o volume plaqueado foi 1 μ l.
- Quando for conhecido o valor de solução fisiológica utilizado na técnica do BAL, deve-se considerá-lo como mais um fator de correção. Por exemplo: se forem utilizados 10, 20 ou 100 ml; multiplicar por 10, 20 ou 100, respectivamente.
- Interpretar como significativo para o diagnóstico de pneumonia contagens:
 - 10^3 UFC para Escovado Brônquico Protegido
 - 10^4 UFC para BAL
- Realizar antibiograma somente para as colônias com contagens significativas.
- Liberar apenas a identificação, sem TSA, para os microrganismos em contagens inferiores à significativa.

Exemplo de cálculo:

Cultura quantitativa de BAL, colhido com 10 ml de solução fisiológica estéril, apresentou crescimento de 80 colônias de *Pseudomonas aeruginosa* com a alça de 10 μ L e 8 com a alça de 1 μ L, além de 5 colônias de *Streptococcus viridans* apenas na sementeira com 10 μ L.

Cálculo:

Pseudomonas aeruginosa –

- 10 (sol. Fisiológica) x 80 (no de colônias) x 100 (alça de 10 μ L) = 80.000 (ou $8 \cdot 10^4$ UFC/ml)
- 10 (sol. Fisiológica) x 8 (no de col.) x 1000 (alça de 1 μ L) = 80.000 (ou $8 \cdot 10^4$ UFC/ml)

Streptococcus viridans –

- 10 (sol. Fisiológica) x 5 (no de col.) x 100 (alça de 10 μ L) = 5.000 (ou $5 \cdot 10^3$ UFC/ml)

Relatar:

Pseudomonas aeruginosa - $8 \cdot 10^4$ UFC/ml / com antibiograma

Streptococcus viridans - $5 \cdot 10^3$ UFC/ml / sem antibiograma

RELATÓRIO DA BACTERIOSCOPIA

Descrever os achados da bacterioscopia do centrifugado, lembrando que será melhor quando feita em citocentrífuga.

Relatar:

- Relação células epiteliais/neutrófilos.
- Descrever presença de bactérias e, particularmente, se houver presença de microrganismos fagocitados, quanto ao seu padrão morfo-tintorial (forma e reação ao gram) e se há predomínio de algum tipo.

RELATÓRIO DA CULTURA

Culturas quantitativas de amostras do trato respiratório inferior, relatar:

- Contagem final do(s) microrganismo(s) isolado(s)
- Quando isolar um ou até dois microrganismos em contagens significativas (vide parâmetros), fazer antibiograma
- Comentar: contagem bacteriana significativa – bom valor preditivo de infecção se a clínica for concordante.

Quando as contagens não forem significativas ou mais de dois microrganismos isolados e bacterioscopia com predomínio de células epiteliais sobre os leucócitos, relatar: "Presença de bactérias do trato respiratório superior" - sem valor diagnóstico.

Contagens bacterianas consideradas significativas

Escarro, aspirado endotraqueal, lavado brônquico	=	10 ⁵ - 10 ⁶ Ufc/ml
Escovado brônquico protegido	=	10 ³ Ufc/ml
Lavado broncoalveolar (BAL)	=	10 ⁴ Ufc/ml

CANDIDA EM SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS

A Pneumonia causada por *Candida* spp. é considerada uma raridade e o diagnóstico só pode ser definido por biópsia pulmonar que revele invasão tecidual e não por cultura. É muito freqüente a presença qualitativa de *Candida* spp. em todos os materiais obtidos de pacientes com cânula orotraqueal ou traqueostomia.

O relato de isolamento de *Candida* costuma induzir a terapêutica desnecessária, com custo elevado, com efeitos colaterais e seleção de cepas resistentes. Mesmo contagens significativas de leveduras devem ser consideradas com cautela, pois pode apenas representar colonização. Exceção deve ser feita aos recém-natos pré-termo e de baixo peso. Nestes, a mortalidade por candida apresenta níveis bastante elevados e a possibilidade de infecção invasiva deve ser considerada. Outros fungos como *Histoplasma*, *Cryptococcus* spp. e mesmo *Aspergillus* spp. (particularmente em imunossuprimidos) devem ser identificados e relatados.

LAUDO PARA PLEURAL

Todo o cuidado deve ser tomado para evitar contaminação deste material. A bacterioscopia do sedimento centrifugado é muito útil para avaliar a presença de bactérias, micobactéria e eventualmente fungos, bem como as características da celularidade.

Alguns patógenos encontram-se em pequena concentração (*Haemophilus*, pneumococo, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*) ou mais raramente podem ser Anaeróbios, fastidiosos ou fungos. Relatar o isolamento de bactérias potencialmente patogênicas (acima relacionadas). No caso de *Staphylococcus* coagulase negativo, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus viridans* e outras bactérias da flora cutâneo-mucosa, é conveniente comparar com os achados da bacterioscopia e na dúvida contatar o clínico e solicitar nova coleta com anti-sepsia rigorosa.

LAUDO PARA ABSCESSO PULMONAR

Os mesmos potenciais patógenos do derrame pleural podem estar presentes, incluindo os anaeróbios e fungos e somados às Nocardias, Micobactérias, *Bacillus anthracis*, etc.

O exame microscópico da amostra do material deve ser processado pela microbiologia e pelas técnicas histológicas. As colorações de Gram e Ziehl, exame direto com azul de algodão e se possível o Giemsa serão muito úteis na busca do agente etiológico e na sugestão de meios de cultura para semeadura, para orientar tempo de incubação, etc. Relatar o isolado se potencialmente patogênico.

Cautela na liberação de resultados de cultura se exames microscópicos forem negativos e a cultura revelar bactérias potenciais contaminantes de pele. Outras causas de abscesso devem ser consideradas (neoplasia, infarto, etc.).

LAUDO PARA OCULAR

- Os potenciais patógenos devem ser distinguidos dos potenciais contaminantes de mucosas, sendo o recurso mais simples a bacterioscopia do material, quando necessário concentrado fazendo-se

uma suspensão do swab em salina e centrifugado em cito-centrífuga. No entanto é comum a bacterioscopia ser inconclusiva, tanto pela dificuldade de caracterizar a bactéria como pelas outras etiologias (viral, *Chlamydia trachomatis*, alérgica, química, uso prévio de colírios com antibióticos, etc.).

- Infecções de glândula lacrimal, ordéolo e blefarite podem envolver amostras de *S. aureus*. Conjuntivite bacteriana pode ser atribuída à *N. gonorrhoeae* em recém-nascidos. A presença de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* são outras possibilidades etiológicas.
- Isolamento de bactérias como *S. aureus* ou os outros agentes relacionados, concordantes ou não com a bacterioscopia, desde que não descrito como raríssimas colônias, deve ser relatado e realizado o antibiograma.
- Úlcera de córnea pode envolver *P. aeruginosa* e outros oportunistas inclusive protozoários (*Acanthamoeba*). Cautela no caso de isolamento de *Neisserias* saprofitas, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp. e outros potenciais habitantes de mucosas. Comparar sempre o resultado da bacterioscopia, com a quantidade de bactérias isoladas, se houve crescimento puro ou quase puro.
- Relatar: cultura positiva para bactéria da microbiota de mucosas – sem valor diagnóstico. Sugerir nova coleta.
- Endoftalmite envolve bactérias potencialmente patogênicas como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, pneumococo, *Haemophilus* spp., *N. meningitidis*, e outros agentes relacionados a fatores predisponentes como imunossupressão, diabetes, trauma, cirurgia, endocardite, bacteremia, etc.
- O material deverá ser obtido por punção e evitar contaminação. Eventualmente anaeróbios e fungos podem estar presentes. O exame microscópico poderá ajudar a evidenciar o agente e orientar o meio de cultura mais adequado ou apenas o resultado da cultura poderá revelar o agente, que poderá ser um dos listados acima.
- No caso de potenciais contaminantes que crescem em pequena quantidade, sem respaldo da bacterioscopia, identificar o agente e relatar: “bacteria da flora de mucosas, papel patogênico duvidoso”. Guardar a bactéria por sete dias para eventual teste de sensibilidade.

LAUDO PARA LÍQUIDO CÉFALO RAQUIDIANO (LCR)

- Os agentes clássicos das meningites devem ser relatados bem o antibiograma.
- A bacterioscopia pode ser relatada sem resultado positivo de cultura quando o microbiologista sentir confiança no diagnóstico.
- No caso de isolamento na cultura de potenciais contaminantes de pele, em caso de meningite bacteriana sem fator predisponente (imunossupressão, cirurgia, etc) e bacterioscopia discordante ou negativa, relatar: “O agente isolado com o comentário: potencial contaminante de coleta”. O antibiograma será realizado apenas a pedido médico.
- Não cultivar LCR em caldo de cultura, pois aumenta muito a chance de isolamento de contaminantes.
- LCR obtido pelo “shunt”: a maioria das infecções em pacientes com shunts, ou derivações são bactérias da flora cutânea como *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp. , *Neisserias* saprofitas e *Acinetobacter* spp. Neste caso devem ser considerados e relatados. Eventualmente *Propionibacterium* spp. podem estar envolvidos. Na dúvida solicitar novo material para confirmação. Bactéria que cresce no caldo e não cresce no ágar, se não for fastidioso ou anaeróbio em geral é contaminante.

LAUDO PARA FEZES

- Os potenciais agentes de diarreia são muitos.
- laboratório deve listar apenas os agentes pesquisados na sua rotina ou quando especificado pelo clínico relatar o resultado sobre os agentes solicitados.
- Relatar: “Cultura negativa para os seguintes enteropatógenos pesquisados: *E. coli* clássica, *E. coli* invasora, *E. coli* O 147 EHEC, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp. (opcional), *Plesiomonas shigelloides* (opcional).

- Relatar pesquisa de leucócitos quando realizada pois dá suporte a infecções por *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*.
- No caso de realizar cultura para *Campylobacter* de rotina, incluí-lo no relatório. Lembrar que diarreia/enterocolite em pacientes com mais de 3 dias de hospitalização e fazendo uso de antimicrobianos pode ser *Clostridium difficile*, devendo pesquisar a toxina com kits específicos.
- Diarreia com mais de 7 dias de duração em imunocomprometidos pode ser por parasitas (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora belli* e em paciente com HIV, complexo do *Mycobacterium avium*).

LAUDO PARA PELE, ABSCESSOS E FERIDAS

- Abscesso tecido subcutâneo
- Abscesso cerebral
- Abscesso intranegabdominal

Embora sejam os três materiais abscesso, o microbiologista deve ter em mente expectativa de isolamento de diferentes agentes.

- Os abscessos fechado e puncionados com técnica asséptica são considerados materiais de bom valor preditivo diagnóstico quando revelam bactérias ou fungos.
- Deve-se, portanto, orientar o médico para obter material nas melhores condições de assepsia possível.
- Encaminhar rapidamente o material para o laboratório.
- Para abscessos considerar a possível participação de anaeróbios estritos ou microaerófilos. Quando disponível fornecer meio de transporte adequado ou orientar para enviar o material na seringa sem agulha.
- Fazer lâmina para bacterioscopia, e, se indicado, exame direto com KOH 10% para pesquisa de fungos, assim como pesquisa de BAAR para micobactérias.
- Nos abscessos de tecido subcutâneo e cerebral a bacterioscopia pode dar orientação útil para escolha dos meios de semeadura ou ajudar no resultado. *S. aureus* é a causa mais importante em abscesso subcutâneo, mas em caso de associação com mordida, os fastidiosos devem ser lembrados.
- No caso de abscesso cerebral, o diagnóstico correto e rápido é de extrema valia. O exame microscópico pode ser muito útil se revelar algum agente. Pode haver participação dos mais variados agentes como bactérias comuns, fastidiosos, fungos, nocardia, micobactérias, etc. Deve-se procurar semear no maior número de meios diferentes, inclusive em caldo tioglicolato.
- No caso de abscesso abdominal a associação de enterobactérias com anaeróbios é esperada. Dependendo da história clínica lembrar de *Salmonella* e *Yersinia*.
- No caso de abscesso de tecido subcutâneo o resultado ideal é quando concordante com a bacterioscopia e revelando agente potencialmente patogênico. O *S. aureus* e *Streptococcus* beta hemolíticos causam mais celulite, mas podem ser isolados em abscessos, sendo as enterobactérias raras.
- No caso da cultura revelar bactérias da microbiota, mas concordante com a bacterioscopia (*S. viridans*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Coryneformes*, etc.); liberar o resultado com o antibiograma.
- No caso de bacterioscopia negativa ou discordante e, principalmente em abscesso drenando há alguns dias, liberar o resultado fazendo restrições sobre a possibilidade de contaminação; a bactéria isolada possivelmente representa contaminação pela microbiota da pele, assim, guardar a bactéria por sete dias e não fazer o antibiograma.
- No caso de abscesso cerebral se o exame microscópico revelar possível agente, o clínico deve ser imediatamente comunicado e informado do andamento dos exames de cultura.
- Tanto bactérias potencialmente patogênicas como possíveis contaminantes de pele ou mucosas podem ser isoladas, mas o clínico deve estar informado e o teste de sensibilidade poderá ser feito de qualquer destas bactérias.

- Os abscessos abdominais polimicrobianos da comunidade em geral respondem à terapêutica empírica e não exigem a identificação de todas as bactérias aneróbias facultativas e anaeróbias estritas. Importante relatar quando isolar enterococcus ou enteropatógenos ou bactérias não comuns ou nos casos de insucesso terapêutico; indica-se identificar os agentes isolados e fazer o antibiograma.

FERIDA / LESÃO CUTÂNEA

Em geral estes materiais são feridas de origem na comunidade. O relatório de cultura de ferida aberta ou lesão depende muito de saber se a coleta foi adequada removendo secreções superficiais ou não. Relatar quando isolar *S. pyogenes*, *S. aureus* e fastidiosos em condições clínicas concordantes (mordida, acidente com água, terra, etc).

- Enterobactérias e *Pseudomonas* podem ser contaminantes ou patogênicos. Deve-se relatar o achado, mas colocar como ressalva a possibilidade de contaminação.
- *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus* coagulase negativo, Coryneformes, etc., sugerem contaminação

Dá respaldo a possibilidade de isolamento de agente patogênico quando são atendidos os seguintes requisitos:

- Coleta bem feita.
- Bacterioscopia concordante com a cultura e
- Ocorrem muitas colônias de uma mesma bactéria, isoladas em cultura pura ou em nítido predomínio.

FERIDA CIRÚRGICA

São esperadas bactérias endógenas ou tipicamente de origem hospitalar (Enterobacterias, *S. aureus*, *Pseudomonas*, etc). Para o relatório de cultura e indicação de antibiograma deve-se contar com coleta bem feita, e os resultados devem ser comunicados a CCIH.

Neste caso infecções polimicrobianas são comuns, devendo-se considerar os gêneros predominantes. Deve-se guardar as cepas isoladas por período maior (mínimo 30 dias) para eventual investigação de surto e fazer antibiograma com atenção para pesquisa de bactérias multiresistentes.

DRENO / FÍSTULA

São materiais que não deveriam ser coletados, pois na maioria das vezes representam colonização dos drenos. Mesmo fístulas de osteomielite não são adequadas.

Nos casos em que a bactéria encontrada já tenha sido isolada de procedimento com menor risco de contaminação (biópsia, punção, etc.) e persiste, relatar o achado e fazer antibiograma. Para os demais casos relatar os gêneros que predominaram na cultura, sem antibiograma e que representam possível contaminação. Guardar as bactérias por sete dias. Considerar que fístulas espontâneas podem revelar presença de micobacteriose, micoses, actinomicose, etc.

BIÓPSIA

As biópsias devem seguir critérios cirúrgicos de antisepsia. Assim representam material de bom valor preditivo diagnóstico. O material deverá em condições assépticas ser triturado em gral e semeado qualitativa e quantitativamente para posterior cálculo aproximado do conteúdo bacteriano por grama de material. Utilizam-se as seguintes amostras: tecido, material de queimadura, material ósseo.

Condições que dão segurança para liberação do resultado e antibiograma:

- Condições adequadas de coleta, transporte e processamento preliminar.
- Bacterioscopia concordante com achados de cultura.
- Cultura pura ou predomínio de algum germe em particular.
- Contagens >10⁴ UFC/g tecido

Para os demais casos:

- Bacterioscopia negativa ou discordante

- Culturas polimicrobianas
- Isolamento de bactérias da flora cutâneo-mucosa (*Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, corineformes, *Neisseria* spp., etc)
- Baixas contagens < 10⁴ UFC/g de tecido; relatar o(s) agente(s) isolado(s), sua contagem sem antibiograma e guardar a(s) bactéria(s) por sete dias.

GÂNGLIO

O gânglio quando infectado pode revelar agentes importantes de doenças localizadas ou sistêmicas, de origem: bacteriana (incluindo os fastidiosos), raramente anaeróbios; e micobacteriose, fungos, protozoários e vírus.

Cabe ao laboratório aproveitar ao máximo. Uma parte será enviada para estudo histológico e o restante do material deverá ser triturado e realizado exame microscópico (Gram, direto com KOH 10%, Giemsa) e culturas para bactérias (em meios ricos), fungos e micobactérias; caldo BHI com suplemento (pode ser o balão de hemocultura) e tioglicolato com suplemento.

Procurar identificar o gênero e espécie com segurança e na dúvida encaminhar a laboratório de referência. No caso de isolamento de bactérias da flora cutâneo-mucosa e sem correlação com a bacterioscopia relatar o achado sem antibiograma e guardar a bactéria por sete dias.

Contactar o clínico e o patologista, e se persistir a suspeita de etiologia bacteriana, quando possível, solicitar nova amostra.

LAUDO PARA GENITAL

URETRAL

Os principais agentes etiológicos das uretrites estão bem estabelecidos:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ▪ <i>Chlamydia trachomatis</i> ▪ <i>Mycoplasma</i> spp. ▪ <i>Ureaplasma</i> spp. ▪ <i>Herpes simplex</i> (vírus) | <p>Mais raramente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Trichomonas vaginalis</i> ▪ <i>Haemophilus</i> spp. ▪ outros |
|---|--|

Colher sempre lâmina para bacterioscopia:

- *Trichomonas*: colher urina e centrifugar para fazer pesquisa no sedimento imediatamente após a coleta.
- *Chlamydia*: o diagnóstico melhor é imunológico (Imunofluorescência)
- *Mycoplasma* e *Ureaplasma*: existem meios específicos e kits muito práticos com cultura semi-quantitativa por avaliação visual de mudança de cor.

No resultado da cultura é importante comparar com a bacterioscopia e estar alerta para não dar falsos resultados de *N. gonorrhoeae* confundindo com *Neisserias* saprófitas e *Acinetobacter*.

Quando isolar *Staphylococcus* coagulase negativo ou outras bactérias da flora genital relatar: "Presença de bactérias da flora genital", não fazer antibiograma. Sugerir, quando não realizado, a pesquisa de *Chlamydia* e *Micoplasma*.

Quando isolar enterobactérias, *Enterococcus* em cultura pura ou em grande quantidade e for concordante com a bacterioscopia, relatar o isolamento com antibiograma e concluir: "Bactéria raramente isolada como agente de uretrite; sugerimos investigar outras causas como *Chlamydia*, *Micoplasmas*, *Trichomonas* etc."

VAGINAL

As principais causas de vaginite são: vaginose, *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*. Em meninas e pacientes na menopausa ou deficientes hormonais, enterobactérias, *S. aureus* e mesmo bactérias da flora podem eventualmente estar relacionadas com a sintomatologia.

A bacterioscopia é sempre útil para observar:

- presença de leveduras
- presença e quantidade de neutrófilos
- presença e predomínio de bactérias
- presença de *Gardnerella* spp. e *Mobiluncus* spp., e outros anaeróbios que caracterizam a vaginose, associados às "clue cells" (células características do epitélio vaginal abarrotadas de bactérias).

A bacterioscopia também é útil:

- Quando isolar *Candida* spp. e for caso de doença recidivante é interessante (quando disponível) a identificação de espécie, podendo ser necessário também o teste de sensibilidade (mais fidedigno e prático)
- Quando isolar *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A, *Streptococcus agalactiae*, enterococos, *Listeria* spp.

Quando a bacterioscopia for normal, com raros neutrófilos, presença de células epiteliais e bacilos de Doderlein, e houver crescimento de raros Gram positivos e/ou raras enterobactéria, relatar: "Presença de bactérias da flora vaginal normal"

Se isolar numerosas colônias de enterobactérias ou *S. aureus* e a bacteriocopia sugerir alteração de flora, relatar: "Presença de bactérias da flora vaginal com predomínio de: por exemplo, *E. coli*, Enterococcus spp, *S. aureus*, etc."

ENDOCERVICAL

A cultura de secreção endocervical pode ser útil para isolamento de *N. gonorrhoeae* quando houver suspeita. Deve-se recomendar a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* nos casos de cervicite.

O isolamento de enterobactérias, enterococcus, etc. pode significar alteração de microbiota por diferentes causas, mas o achado deve ser relatado, para consideração do médico. No caso da bacterioscopia revelar presença de freqüentes, numerosos ou incontáveis neutrófilos (++ a ++++) e presença de bactérias com a morfologia e Gram concordantes com as bactérias encontradas na cultura, relatar: "Alteração da flora endocervical/vaginal com a presença das bactérias isoladas com antibiograma" - lembrando que outras causas devem ser investigadas e/ou afastadas antes de iniciar o tratamento específico

No caso de material endometrial e amniótico, fazer cultura para anaeróbios e bacterioscopia. No caso de não realizar cultura para anaeróbios, relatar a bacterioscopia e o resultado da cultura. Destacar a possibilidade de anaeróbios se visualizar bactérias no Gram sem correspondente crescimento.

ESPERMA E/OU FLUÍDO PROSTÁTICO

É aconselhável para elaborar um laudo adequado :

- Fazer bacterioscopia do esperma e da secreção prostática
- Verificar contagem de leucócitos
- Semear com alça calibrada de 10 µL e fazer contagem de colônias
- Relatar os achados de bacterioscopia, contagem de leucócitos e bactéria isolada em contagens = 10³ Ufc/ml. No caso de enterobactérias, enterococos e *Pseudomonas* fazer antibiograma.

No caso de isolamento de estafilococos, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e outras bactérias da flora uretral, principalmente em prostatite crônica, sugerir a pesquisa de outros agentes (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Trichomonas*, vírus, etc.), sem liberar antibiograma.

LAUDO PARA URINA

Para a interpretação da urocultura, algumas informações são consideradas úteis:

- Se o paciente apresenta sintomas de infecção urinária, Leucocitúria
- Gestante, Idade/sexo
- Tipo de coleta: jato médio, coletor, punção de sonda vesical em sistema fechado, punção supranegpública, etc.
- Uso prévio de antibióticos à coleta da presente amostra, etc.

URINAS COLETADAS POR JATO MÉDIO

Quando estas urinas são submetidas a cultura sem informação clínica específica sugere-se que contagens de colônias $< 10^5$ UFC/ml possam também causar infecção, somente se um único microrganismo e potencial patógeno for isolado. Prováveis contaminantes são: difteróides, *Streptococcus viridans*, Lactobacilos, estafilococos coagulase negativa e outros que não sejam classificados como *Staphylococcus saprophyticus*.

Contagem de colônias $\geq 10^5$ UFC/ml:

Um provável patógeno	<ul style="list-style-type: none"> Definitivamente identificar ao nível de espécie e realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
Um provável contaminante (difteróides, <i>S. viridans</i> , lactobacilos, estafilococos coagulase negativa e outros que não sejam <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .)	<ul style="list-style-type: none"> No caso de paciente assintomático solicitar nova amostra, pois se trata de provável bacteriúria assintomática. No caso da presença de outras espécies em contagens $< 10^4$ UFC/ml, relatar número de microrganismo(s) presente. Realizar uma identificação limitada: por exemplo distinguir <i>entre S. saprophyticus</i> de outros estafilococos coagulase negativa, ou <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B) de <i>Streptococcus viridans</i>. Não fazer antibiograma e sugerir nova coleta. É raro, mas não impossível, ocorrer infecção urinária por bactérias da microbiota da uretra ou vagina. Para caracterizar ITU há necessidade de confirmar o achado com nova urocultura, e que esteja associada a sintomas. Sintomas e leucocitúria podem tornar muito provável o diagnóstico. Sem sintomas pode ser bacteriúria assintomática ou falha grosseira na coleta. Enumerar outras espécies eventualmente presentes em $< 10^4$ UFC/ml.
Dois prováveis patógenos (com um diagnóstico de infecção do trato urinário crônica ou recorrente)	<ul style="list-style-type: none"> Definitivamente identificar ao nível de espécie. Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
Dois prováveis patógenos (com sintomas de ITU)	<ul style="list-style-type: none"> Identificar ao nível de espécie. Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma). Solicitar nova amostra para confirmação.
Mais que dois microrganismos	Reportar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."

Contagem de colônias $\leq 10^5$ UFC/ml:

Um provável patógeno	<ul style="list-style-type: none"> Para pacientes sob antibioticoterapia, grávidas, recém-nascidos, com infecção urinária de repetição, realizar identificação e teste de sensibilidade. Um potencial patógeno presente em $> 10^2$ UFC/ml em mulheres sintomáticas e $> 10^3$ UFC/ml em homens sintomáticos, fazer identificação e antibiograma.
Um provável contaminante	<ul style="list-style-type: none"> Leucócitos normais: descritivamente identifique o isolado. Leucócitos aumentados: solicite nova amostra.
Mais que dois microrganismos	Relatar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."
Sem informação clínica	<ul style="list-style-type: none"> Descreva o microrganismo presente entre 10^4 e 10^5 UFC/ml, com base na morfologia. Entre em contato com o paciente e/ou médico. Solicite informações e/ou a coleta de nova amostra. Caso o contato não seja possível, mantenha a cultura a temperatura ambiente por 3 dias para possível retomada de identificação, se requerido pelo médico do paciente.

URINAS COLETADAS POR CATETERIZAÇÃO

Contagem de colônias $\geq 10^4$ UFC/ml:

Dois ou mais prováveis patógenos	<ul style="list-style-type: none">Realize a identificação e teste de sensibilidade de ambos os isolados.Descritivamente identifique as espécies presentes em $< 10^4$ UFC/ml.
Um ou dois prováveis contaminantes	<ul style="list-style-type: none">Reportar o(s) microrganismo(s) presente(s) com descrição do tipo(s) morfológico(s), exemplo, difteróides, <i>Streptococcus</i> do grupo viridans.Reportar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."
Um provável patógeno e um provável contaminante	<ul style="list-style-type: none">Identificar o provável patógeno e fazer antibiograma.Fornecer o tipo morfológico do provável contaminante.
Três ou mais microrganismos	<ul style="list-style-type: none">Fornecer uma descrição dos tipos morfológicos.Reportar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."

Contagem de colônias $< 10^4$ UFC/ml:

- Para pacientes sob antibioticoterapia, mulheres sintomáticas, homens sintomáticos, realizar identificação e teste de sensibilidade.
- Para todos os outros pacientes, forneça uma descrição do(s) tipo(s) morfológico(s) presente(s) e requeira nova amostra.
- Mantenha a cultura a temperatura ambiente por 3 dias para se necessário retomar o processamento de identificação se requerido pelo médico do paciente.

Obs.: Uroculturas com candida provenientes de pacientes sondados são utilizadas como critério para a troca da sonda. Sugere-se nova coleta de urocultura após 24 horas. Caso o isolamento de Candida seja mantido, deve-se relatar, pois poderá haver necessidade de instituir terapia específica.

URINAS COLETADAS POR PUNÇÃO SUPRAPÚBICA

Um ou dois patógenos presentes	<ul style="list-style-type: none">Identifique ao nível de espécie.Realize o teste de sensibilidade do provável agente patogênico.
Três ou mais patógenos presentes	<ul style="list-style-type: none">Identifique.Mantenha a cultura por três dias para possível consulta.Examine em até 48 horas de incubação.
Sem crescimento	<ul style="list-style-type: none">Reporte "Sem crescimento, teste com sensibilidade de $> 10^2$ UFC/ml em 48 h" - (para semeadura de 10μl).

OBSERVAÇÕES

- Não realizar cultura de ponta de sonda vesical.
- Critério de positividade pode ser aplicado sempre que isolar $\geq 10^5$ UFC/ml de um só agente, devendo a presença de sintomas caracterizar a infecção do trato urinário e a ausência como bacteriúria assintomática.
- Realize pesquisa para anaeróbios somente em punções supra-púbicas, quando solicitado.
- Não realize de rotina o teste de sensibilidade diretamente da amostra de urina, embora em situações de urgência da disponibilidade do antibiograma isto possa ser feito.
- Em caso de dúvida na interpretação da urocultura, se possível, entre em contato com o paciente e/ou médico para maiores informações, conferindo as condições de coleta. Isto não sendo possível, relate o numero de diferentes microrganismos encontrados e sua contagem e solicite nova amostra.

LAUDO PARA SANGUE

Em caso de bacteremia, septicemia, ou febre a esclarecer, deve-se sempre que possível colher duas amostras de sangue venoso (periférico) de locais diferentes. Se o paciente tiver cateter, colher mais uma amostra obtida do cateter.

Bactérias isoladas no sangue periférico do tipo *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, tem elevado valor preditivo de infecção.

- Enterococos tem significância clínica em 80% dos casos
- *Streptococcus viridans* entre 40 a 60%:
 - 1 cultura positiva em duas obtidas – é muito provável uma contaminação
 - 2 ou mais culturas positivas – é muito provável a infecção
 - 1 colhida e positiva. Colher nova amostra
- *Staphylococcus coagulase negativa* entre 20 a 40%:
 - 2 amostras colhidas e positivas – verificar se são da mesma espécie ou se tem mesmo antibiograma. Se diferirem na espécie e/ou nitidamente no antibiograma é provável que houve contaminação de coleta. Não liberar antibiograma.
 - 2 amostras colhidas e 1 positiva – solicitar nova amostra – provável contaminação. Não fazer antibiograma.
 - 2 amostras colhidas e identificadas como da mesma espécie e com mesmo antibiograma – Liberar resultado da cultura e antibiograma e destacar: "Bactéria da flora cutânea. Instituir tratamento específico se evidências clínicas de infecção. Se o paciente estiver com cateter, possível colonização."
- Outras bactérias isoladas de em uma única amostra e sugestivas de contaminação: *Micrococcus* spp., corineformes, *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp.

Hemoculturas positivas e repetidas para bactérias potencialmente contaminantes podem ser consideradas patogênicas quando afastada a contaminação por cateter. Considerar a hipótese de endocardite. Quando houver suspeita de fastidiosos ou fungos ou micobactérias conservar as hemoculturas por 30 a 40 dias.

Relação entre idade e volume ideal de sangue a ser coletado

Idade	volume
< 1 mês	1-2 ml
1 mês a 2 anos	2-3 ml
> 2 anos a 10 anos	3-5 ml
Adolescente	10-20 ml
Adulto	40 ml

PONTA DE CATETER

- Fazer cultura qualitativa não se justifica para diagnóstico de bacteremia. Deve-se relatar o número de colônias isoladas e a(s) bactérias isolada(s) pela técnica semi-quantitativa de Maki.
- Quando maior que 15 colônias, identificar, mas não fazer antibiograma. Se a hemocultura for positiva fazer antibiograma da hemocultura.
- No caso de bacteremia, a remoção do cateter e envio da ponta para cultura se justifica quando a amostra de hemocultura for colhida no prazo de 24 h.
- Considerando que a colonização de cateter é muito comum, se não houver bacteremia não se justifica identificar bactérias do cateter e fazer antibiograma, exceto se houver indicação de monitoramento dos cateteres pela CCIH. Caso a hemocultura seja negativa, não se justifica trabalhar com bactérias do cateter. As técnicas de investigação de contaminação da luz do cateter justificam-se quando se deseja descobrir fonte de bacteremia, fungemia, abscessos em múltiplos órgãos, etc.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barenfanger, J. **Improving the clinical utility of microbiology data: an update.** Clin Microbiol Newsl, 25(1): 1-8, 2003.
2. Baron, E.J. and Tenover, S.M. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology.** 8th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1990.
3. Laffeneur, K., Janssens, M., Charlier, J., Avesani, V., Wauters, G., and Delmée, M. **Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods.** J Clin Microbiol, 40(3):1085-1087, 2002.
4. Christensen, W.B. **Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types.** J Bacteriol, 52:461-466, 1946.
5. Eschenbach, D.A., Pollock, H.M. and Schachter, J. **Laboratory diagnosis of female genital tract infection.** CUMITECH. Coord. Ed. S.J. Rubin, ASM, Washington, DC, 1983.
6. Evangelista, E.T. and Beilstein, H.R. **Laboratory diagnosis of gonorrhoea.** CUMITECH. Coord. Ed. C. Abramson. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993.
7. Balows A., Hausler, W.J. Jr., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. **Manual of clinical microbiology.** 5th Ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991.
8. Forbes, B.A., Sahm, D.S. and Weissfeld, A.S. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology.** 10th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1998.
9. Isenberg, H.D. **Clinical microbiology procedures.** ASM Microbiology, Washington, DC, 1992.
10. Isenberg, H.D. **Essential procedures for clinical microbiology,** American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998.
11. Koneman, E.W., Allen, D.S., Janda, M.W., Schreckenberger C.P. and Winn Jr., C.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology,** 5th ed., Lippincot, Philadelphia, 1997.
12. Mayhall, C.G. **Hospital epidemiology and infection Control.** Williams & Williams, 1996.
13. Mc Faddin, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
14. Mc Neil, M.M. and Brown, J.M. **Actinomycetes: epidemiology and microbiology.** Clin Microbiol Rev, 7(3): 357-417, 1994.
15. Murray, P.R., Baron, J.E., Pfaller, A.M., Tenover, C.F. and Tenover, H.R. **Manual of clinical microbiology.** American Society for Microbiology, 7th ed., Washington. DC, 1999.
16. NCCLS. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria.** Approved standard, v.17, no. 2, National Committee for Clinical Laboratories Standards, Villanova, 1997.
17. Oplustil, C.P., Zoccoli, C.M., Tobouti, N.R., e Sinto, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica,** Sarvier, São Paulo, 2000.
18. Rhoden, R.A. and Hermann, G.J. **Isolation and identification of *Enterobacteriaceae* in the clinical laboratory.** U.S, DHEW, Center for Disease Control, Atlanta, 1974.
19. Sack, R.B., Tilton, R.C. and Weisfeld, A.S. **Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea.** CUMITECH 12, Coord. Ed. S.J. Rubin, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1980.
20. Schreckenberger, P.C. **Questioning dogmas: proposed new rules and guidelines for the clinical microbiology laboratory.** American Society for Microbiology News, 67: 388-89, 2001.
21. Schrenkenberger, P.C. **Practical approach to the identification of glucose nonfermenting Gram-negative bacilli: a guide to identification.** 2nd. Ed., University of Illinois, College of Medicine at Chicago, CACMLE, 1996.
22. Thayer, J.D. and Martin Jr., J.E. **A seletive medium for the cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*.** Public Health Rep, 79:49-57, 1964.
23. Toledo. M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. **EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase.** Rev Microbiol, 13(04): 309-315, 1982.
24. Toledo. M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. **MILi: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase.** Rev Microbiol, 13(04):230-235, 1982.

Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica

Módulo VI

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Coleta de amostras	2
Amostras respiratórias	2
Sangue	2
Urina	3
Fezes.....	3
Biópsias ou amostras de tecido.....	3
Lavado gástrico.....	3
Outros materiais: medula óssea, líquido, líquido pleural	4
3. Processamento de amostras	5
Exame microscópico e coloração	5
Métodos para tratamento das amostras para cultura.....	7
4. Cultura para isolamento de micobactérias	10
Meios sólidos	10
Meios Líquidos	10
Controle de Qualidade.....	12
5. Identificação das diferentes espécies de micobactérias.....	14
Testes bioquímicos tradicionais.....	14
Testes automatizados e moleculares para identificação	20
6. Anexos.....	24
7. Referências Bibliográficas.....	27

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação mundial com a tuberculose, os laboratórios de Microbiologia têm sido cada vez mais exigidos em relação à rapidez do diagnóstico. Um número maior de amostras é processado no laboratório para realizar este diagnóstico, exigindo que medidas de segurança sejam tomadas e que os técnicos tenham um treinamento adequado nessas técnicas.

Uma variedade de técnicas está sendo implantada nos laboratórios para acelerar o diagnóstico, mas as técnicas convencionais ainda ocupam um espaço importante na rotina laboratorial.

Um importante evento mudou um pouco a visão do que era necessário para o diagnóstico em termos laboratoriais, que foi o aparecimento da AIDS. O perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* passou a ter um papel extremamente importante para o clínico já que a sensibilidade às drogas tradicionais tinha sofrido algumas mudanças o que ocasionava sérias dificuldades no tratamento. Além do aparecimento de cepas multi-resistentes de *M. tuberculosis*, apareceram as infecções por outras espécies de micobactérias nestes pacientes, levando a quadros graves (como por exemplo *M. avium*).

Diante deste fato os laboratórios necessitam estar sempre atualizados. Nos capítulos adiante citamos alguns dos procedimentos mais utilizados para o diagnóstico das infecções por micobactérias.

Manipulação do material clínico

Uma parte importante que deve ser considerada pelo laboratório quando trabalhando com micobactérias, é a segurança empregada na manipulação do material clínico destas cepas. É grande o número de casos de técnicos infectados devido ao descaso dos laboratórios com a manipulação deste tipo de patógeno. Algumas medidas mínimas devem ser tomadas quando o laboratório vai no intuito de diagnosticar este agente.

Se o laboratório for realizar apenas a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no material clínico, sem tratamento (laboratório Nível-1), as seguintes medidas devem ser observadas:

- Colocar na amostra clínica a mesma quantidade de hipoclorito de sódio a 5% e deixar 15 minutos a fim de inviabilizar os eventuais bacilos presentes na amostra. Centrifugar a amostra e do sedimento preparar as lâminas.
- Treinar os técnicos e orientar para os riscos da manipulação inadequada do material clínico.
- Utilizar luvas e aventais descartáveis.

Se o laboratório for realizar também a cultura, além da pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no material clínico direto e após tratamento (Laboratório Nível 2), além das medidas já citadas, o laboratório deve :

- Processar todas as amostras em uma capela biológica classe I ou II que possuem filtros HEPA.
- Utilizar respiradores descartáveis (tipo N95).
- Limitar a entrada de pessoas na área reservada para a manipulação dos materiais.
- Treinamento dos técnicos nas técnicas de cultura e identificação de *M. tuberculosis*.

Se o laboratório for realizar todas as técnicas descritas acima e, além disso, for trabalhar com testes de avaliação da sensibilidade (Laboratório nível 3), deve possuir:

- uma área com ante-sala e uma sala separada onde as amostras são processadas e os testes de sensibilidade são realizados.
- um sistema de exaustão próprio que crie uma pressão negativa nas duas salas.
- uma autoclave deve ser instalada dentro desta área para que todo material seja autoclavado antes de deixar esta área.
- treinamento específico dos técnicos nas técnicas de cultura, identificação e testes de avaliação da sensibilidade das diferentes espécies de micobactérias.

2. COLETA DE AMOSTRAS

AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> - Usar um frasco estéril de boca larga com tampa de rosca. - De preferência, colher as amostras antes da administração de antibióticos, mas não excluir a coleta por causa do uso de antibióticos já que na maioria dos casos o paciente em tratamento para tuberculose não vai suspender a terapia para realizar o exame. - Orientar a coleta do primeiro escarro da manhã. Coletar a amostra após expectoração profunda e evitar colher saliva. - É recomendado um mínimo de 3 amostras de escarro em dias consecutivos. - Entregar instruções por escrito para uma coleta adequada da amostra. - Identificar (nome do paciente, data da coleta) as amostras após a coleta 	<ul style="list-style-type: none"> - Se a amostra não for processada dentro de 1 hora após a coleta, armazenar em geladeira (2 a 8°C) por até 24 horas. - Manter as amostras em geladeira até ter sido examinada por algum método de coloração. - Manter as amostras com exame direto positivo em geladeira para eventuais exames posteriores (no máximo 30 dias) 	<ul style="list-style-type: none"> - Amostras de escarro colhidas durante um período de 24 horas. Estas amostras possuem alta possibilidade de contaminação por outras bactérias e fungos o que prejudica o processamento correto da amostra. - Amostras que não estiverem devidamente identificadas - Amostras coletadas em frascos não estéreis e com conservantes. - Amostras enviadas em "swabs" de coleta 	<ul style="list-style-type: none"> - NALC-NaOH (NALC=N-Acetil-cisteína) - NaOH 4% - ácido oxálico - usado para materiais contaminados com <i>P. aeruginosa</i>.

SANGUE

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> - Seguir as orientações utilizadas no seu laboratório para a assepsia antes da coleta das amostras de sangue para cultura. - Coletar uma amostra de sangue e inocular diretamente meios de cultura apropriados ou no tubo isolator. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não refrigerar as amostras. - Se utilizado o meio bactec 13^a, manter a amostra em estufa a 37°C. - Se forem utilizados os meios que serão lidos em aparelhos automatizados (bactec myco/f lytic, mb/bact), manter os frascos em temperatura ambiente após a coleta. - Se for utilizado o tubo isolator manter em temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Amostras colhidas com EDTA. - Amostras coaguladas. 	<ul style="list-style-type: none"> - As amostras não devem ser previamente tratadas, e sim inoculadas diretamente conforme especificações dos fabricantes de cada frasco. - Meios utilizados para detecção de micobactérias em amostras de sangue: Bactec 13A (BD) ¹ Bactec Myco/Lytic (BD) ¹ MB/BacT (Organon T.) ¹ Isolator (Wampole) ²

¹ Utilizar 5 ml de amostra de sangue ² Utilizar 10 ml de amostra de sangue

URINA

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Coletar a 1ª urina da manhã (mínimo 40 ml) após assepsia genital adequada com água e sabão- Coletar em um frasco estéril de boca larga com tampa de rosca.- É recomendado a coleta de 3 amostras em dias consecutivos	<ul style="list-style-type: none">- Se a amostra não for processada dentro de 3 hora após a coleta, armazenar em geladeira (2 a 8°C) por até 24 horas.	<ul style="list-style-type: none">- Urina colhida durante um período de 24 horas. O elevado número de microrganismos contaminantes presentes nestas amostras prejudica a descontaminação da amostra.- Amostras colhidas em frascos não estéreis.- As 3 amostras colhidas no mesmo dia em horários diferentes.	<ul style="list-style-type: none">- Colocar a urina em um tubo cônico estéril com tampa de rosca e centrifugar a 3000 xg por 15 min.- Desprezar o sobrenadante e tratar a amostra com NALC-NaOH ou NaOH 4%, conforme descrito no anexo A.

FEZES *

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Coletar em frascos de boca larga sem conservantes.	<ul style="list-style-type: none">- Manter as amostras em geladeira até o processamento.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras congeladas.	<ul style="list-style-type: none">- Suspender 1 g de fezes em 5 ml de middlebrook 7h9.- Agitar vigorosamente e tratar pelo método de NaOH 4%.

* Apenas as amostras com pesquisa positiva deveriam ser processadas para cultura.

BIÓPSIAS OU AMOSTRAS DE TECIDO *

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Enviar a amostra em tubo estéril sem conservante ou fixador, com um pouco de solução salina estéril.	<ul style="list-style-type: none">- Processar a amostra assim que for recebida no laboratório.- Manter o material depois de processado na geladeira.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras colhidas em "swabs".- Amostras colhidas em formol.	<ul style="list-style-type: none">- Macerar o material com pistilo estéril dentro do próprio tubo cônico ou em um cadinho estéril adicionando caldo 7H9.- Tratar a amostra pelo método NALC-NaOH ou NaOH 4% e proceder conforme descrito no anexo A.

* Temperaturas diferentes devem ser usadas para incubar os meios inoculados com amostras de pele.

LAVADO GÁSTRICO

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Colher de 5 a 10 ml da amostra em um tubo estéril contendo 100 mg de carbonato de sódio.- Realizar a coleta de manhã em jejum.- Usar salina estéril para a coleta.	<ul style="list-style-type: none">- Manter as amostras em geladeira até serem processadas.- Se na amostra não for adicionado carbonato de sódio esta deve ser processada dentro de 4 horas após a coleta.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras colhidas sem carbonato de sódio.	<ul style="list-style-type: none">- Se a amostra for muito mucóide, adicionar 50 a 100 mg de NALC- Centrifugar a 3000 xg por 15 min.- Suspender o sedimento em água destilada estéril e processar pelo método de NALC ou NaOH 4%.

OUTROS MATERIAIS: MEDULA ÓSSEA, LÍQUOR, LÍQUIDO PLEURAL

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Coletar em tubos estéreis.- Os frascos utilizados para a cultura de sangue também podem ser usados.- Quanto maior o volume processado maior a possibilidade de se ter uma amostra positiva.	<ul style="list-style-type: none">- Manter a amostra na geladeira se não for processada dentro de 24 horas.- Manter as amostras na geladeira após o processamento, por vários dias em caso de haver contaminação da cultura.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras enviadas em tubos não estéreis.- No caso de medula óssea, amostras colhidas sem anticoagulante.	<ul style="list-style-type: none">- Normalmente estas amostras não têm bactérias contaminantes, portanto não são tratadas previamente; são inoculadas diretamente nos meios de cultura.- Meios que podem ser usados para a coleta de amostras:<ul style="list-style-type: none">Bactec 13 ABactec Myco/F LyticMB/BacT *ESP Myco *

* Estes meios não podem ser utilizados para amostras de medula óssea

3. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

EXAME MICROSCÓPICO E COLORAÇÃO

- Todos as amostras clínicas, exceto sangue e medula óssea, devem ser examinadas por algum método de coloração, para a presença ou não de bacilos álcool-ácido resistentes.
- Preparar o esfregaço com no máximo 1 a 2 cm de diâmetro.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Ziehl-Neelsen

Corantes	Procedimento	Resultado
<ul style="list-style-type: none">- <i>Fucsina</i><ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 3 g de fucsina básica em 10 ml de etanol 90%-95%▪ adicionar 90 ml de uma solução aquosa de fenol a 5%- <i>Álcool-ácido</i><ul style="list-style-type: none">▪ adicionar 3 ml de HCl concentrado em 97 ml de etanol a 90%-95%.- <i>Azul de Metileno</i><ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 0,3 g de cloreto de azul de metileno em 100 ml de água destilada	<ul style="list-style-type: none">- Fixar o esfregaço na lâmina, na chama do bico de bunsen.- Cobrir o esfregaço com a fucsina- Aquecer, sem deixar ferver, 3 a 4 vezes em um período de 5 min.- Lavar com água.- Descorar com o álcool-ácido até remover todo o corante - 2 min.- Cobrir o esfregaço com azul de metileno - 2 min.- Lavar com água.- Deixar a lâmina secar ao ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina).- Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.	<ul style="list-style-type: none">- Positivo: bacilos coram em rosa forte, outras bactérias e células coram em azul.- Negativo: não são observados bacilos em 300 campos examinados <p>A interpretação segue descrita na Tabela 1.</p>

Auramina

Corantes	Procedimento	Resultado
<ul style="list-style-type: none">- Auramina fenólica<ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 0,1 g de auramina O em 10 ml de etanol 90%-95%▪ adicionar em uma solução de 3g de fenol em 87 ml de água destilada estéril (estocar a solução em frasco escuro)- Álcool-ácido<ul style="list-style-type: none">▪ adicionar 0,5 ml de HCl concentrado em 100 ml de álcool 70%- Permanganato de potássio<ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 0,5g de permanganato de potássio em 100 ml de água destilada	<ul style="list-style-type: none">- Fixar a lâmina.- Cobrir o esfregaço com auramina e deixar por 15 min.- Lavar com água.- Descorar com álcool-ácido - 2 min.- Lavar com água.- Cobrir o esfregaço com permanganato de potássio - 2 min. e não mais que 4 min.- Lavar com água- Ler em microscópio de fluorescência com objetiva de 40x.	<ul style="list-style-type: none">- Positivo: bacilos coram em amarelo alaranjado em fundo escuro.- Negativo: não há presença de bacilos em 100 campos observados. <p>A interpretação segue descrita na Tabela 1.</p>

Kinyoun

Indicado para micobactérias, *Nocardia* spp. e outros bacilos Gram positivos ramificados que se coram fracamente pela coloração de Ziehl-Neelsen.

Corantes	Procedimento	Resultado *
- <i>Fucsina</i> <ul style="list-style-type: none">dissolver 4 g de fucsina básica em 20 ml de etanol 90%-95%adicionar 100 ml de uma solução aquosa de fenol a 5%	- Fixar o esfregaço na lâmina.	- Positivo: Bacilos coram em rosa forte, outras bactérias e células coram em azul.
- <i>Álcool-ácido</i> <ul style="list-style-type: none">adicionar 3 ml de HCl concentrado em 97 ml de etanol a 90%-95%.	- Cobrir o esfregaço com a fucsina - 5 min.	- Negativo: não são observados bacilos após a observação de 300 campos.
- <i>Azul de Metileno</i> <ul style="list-style-type: none">dissolver 0,3 g de cloreto de azul de metileno em 100 ml de água destilada	- Lavar com água.	A interpretação segue descrita na Tabela 1.
	- Descorar com álcool-ácido até remover todo o corante - 2 min.	
	- Cobrir o esfregaço com azul de metileno - 2 min.	
	- Lavar com água.	
	- Deixar a lâmina secar no ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina).	
	- Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.	

* Um resultado negativo no exame direto do material clínico não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis*. A cultura é necessária para confirmação do diagnóstico.

Interpretação de resultados de pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes

Resultado	Número de microrganismos	
	Auramina objetiva 25x	Ziehl-Neelsen (Kinyoun) objetiva 100x
Negativo	0	0
Duvidoso, repetir a coloração	1-2/30 campos	1-2/300 campos
+ (raros)	1-9/10 campos	1-9/100 campos
++ (alguns)	1-9/campo	1-9 /10 campos
+++ (frequentes)	10-90/ campo	1-9/ campo
++++ (numerosos)	> 90/campo	> 9/campo

A sensibilidade dos métodos está em torno de 22 a 81%. Os métodos não possuem boa especificidade já que outros microrganismos que não micobactérias podem aparecer corados (ex: *Nocardia*, *Rhodococcus*, entre outros).

Se apenas 1 a 2 bacilos são observados em toda a lâmina este resultado não deve ser reportado antes de ser realizado uma outra lâmina. Se o resultado persistir ligar para o médico responsável pelo paciente para discutir o caso.

CONTROLE DE QUALIDADE

Lâminas positivas e negativas devem ser incluídas toda vez que se fizer a coloração e quando novos lotes de corantes são preparados.

- Controle negativo: *Escherichia coli*
- Controle positivo: *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177

MÉTODOS PARA TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA CULTURA.

Algumas amostras podem apresentar flora mista de bactérias e devem ser tratadas para minimizar o crescimento destes microrganismos contaminantes, que crescem mais rápido, impossibilitando o crescimento das micobactérias.

Materiais que devem ou não ser tratados antes de serem semeados nos meios apropriados

Material	Processado	Não processado
Escarro	x	
Lavado bronco-alveolar	x	
Líquor		x
Sangue		x
Pele	x	
Biópsias		x
Lavado gástrico	x	
Urina	x	
Fezes	x	
Medula óssea		x

N-ACETIL-L-CISTEINA/NAOH 2% (NALC-NAOH)

O NALC é um potente agente mucolítico e favorece a utilização de concentrações baixas do descontaminante sem prejudicar a recuperação de micobactérias. A desvantagem é que a solução deve ser preparada diariamente por que ela perde a atividade após 24 horas.

Reagentes	Procedimento
<ul style="list-style-type: none">- N-acetil-L-cisteína- Solução de NaOH/ citrato de sódio: volume 1/1 (autoclavar e estocar em frascos com tampa de rosca)- NaOH 4% (40 g pastilhas de NaOH em 1000mL de água destilada)- Citrato de sódio 0,1M (26 g de citrato de sódio (anidro) em 1000 ml de água destilada).- Tampão fosfato 0,067M, pH 6,8 (pode ser substituído por água)	<ul style="list-style-type: none">- Preparar a quantidade necessária da solução de NALC de acordo com a tabela 3.- Colocar 5 ml da amostra em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 ml.- Homogeneizar vigorosamente.- Deixar 15 - 20 minutos à temperatura ambiente.- Adicionar o mesmo volume de tampão fosfato.- Centrifugar a 3.000 xg por 15 minutos.- Desprezar o sobrenadante em frasco apropriado evitando ao máximo espirros do material. Limpar a borda do tubo com hipoclorito.- Ressuspender o sedimento com tampão fosfato; ressuspender com um volume suficiente para inocular os meios que serão utilizados.- Preparar lâminas para coloração.- Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado ou em frascos próprios contendo hipoclorito.

Preparação da solução para tratamento das amostras com N-acetil-L-cisteína

Volume (ml)	NaOH 4% / citrato de sódio	NALC
25 ml	12,5 ml / 12,5 ml	125 mg
50 ml	25 ml / 25 ml	250 mg
100 ml	50 ml/ 50 ml	500 mg
200 ml	100 ml/ 100 ml	1g
500 ml	250 ml/ 250 ml	2,5g
1000 ml	500mL/ 500 ml	5 g

NAOH 4% (PETROFF)

Esta solução tem atividade descontaminante e para ter atividade mucolítica deve ser usada em concentrações altas (4%). Nessa concentração o NaOH é tóxico para algumas micobactérias o que torna o tempo de exposição do material a esta substância crucial para se obter um bom resultado.

Reagentes	Procedimento
<ul style="list-style-type: none">- Solução de 2% ou 4% de NaOH (1N)- Tampão fosfato de 0,067 M , pH 6,8- Solução de HCl- Indicador vermelho de fenol- Água destilada estéril	<ul style="list-style-type: none">- Colocar 5 ml da amostra em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 ml.- Colocar o mesmo volume da solução de NaOH.- Homogeneizar vigorosamente.- Deixar 15 - 20 minutos à temperatura ambiente- Adicionar o mesmo volume de tampão fosfato (ou água).- Centrifugar a 3.000 xg por 15 minutos.- Desprezar o sobrenadante em frasco apropriado evitando a formação de aerossóis. Limpar o tubo com uma solução de hipoclorito.- Adicionar uma gota de vermelho de fenol no sedimento e adicionar aos poucos a solução de hcl até o indicador mudar de vermelho para amarelo.- Homogeneizar o sedimento.- Inocular a amostra no meio apropriado.- Preparar lâminas para coloração.- Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado ou em frascos próprios contendo hipoclorito.

ÁCIDO OXÁLICO

É o método de escolha para processar amostras contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

Reagentes	Procedimento
<p><u>5% ácido oxálico</u></p> <p>ácido oxálico 50g água destilada 1000 ml</p> <ul style="list-style-type: none">- Dissolver o ácido em um pouco da água destilada- Completar para 1000 ml- Esterilizar a 121°C por 15 minutos- Estocar a temperatura ambiente	<ul style="list-style-type: none">- Adicionar um volume de 5% de ácido oxálico. equivalente ao da amostra em um tubo cônico de 50 ml.- Homogeneizar vigorosamente por 30 segundos.- Deixar a temperatura ambiente por 30 minutos agitando o tubo ocasionalmente.- Adicionar nacl 0,85% até a marca de 50 ml do frasco.- Inverter o tubo várias vezes para mistura.- Centrifugar por 15 a 20 minutos a 3000xg.

Vermelho de fenol

vermelho de fenol 8 mg
4% NaOH 20 m L
água destilada 1000 ml

- Dissolver o vermelho de fenol em 4% NaOH utilizando um agitador magnético; se necessário aquecer levemente
- Completar com 1000 ml de água destilada
- Estocar a temperatura ambiente

4% NaOH

NaOH 40g
água destilada 1000 ml

- Dissolver o NaOH em um pouco de água
- Manter o frasco resfriado para evitar aquecimento
- Completar para 1000 ml com água destilada. Esterilizar a 121°C por 15 min. Estocar a temperatura ambiente

NaCl 0.85% estéril

- Desprezar o sobrenadante.
- Adicionar ao sedimento algumas gotas de vermelho de fenol.
- Neutralizar o sedimento com 4% NaOH até obter uma cor rosa claro.
- Preparar as lâminas e semear nos meios apropriados.

4. CULTURA PARA ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS

MEIOS SÓLIDOS

LOWENSTEIN-JENSEN

a) Composição: ovos coagulados, verde malaquita, sais, glicerol, farinha de batata

b) Inoculação: 0,5 a 1,0 ml do material clínico

c) Incubação: 37°C em estufa com 5% a 10% de CO₂, na ausência de luz, com exceção de amostras de pele em que o meio deve ser incubado a 30°C, por até 8 semanas. Nas 2 primeiras semanas manter os tubos na posição horizontal com as tampas um pouco desrosqueadas, depois colocar na vertical e apertar as tampas.

d) Leituras: ler duas vezes durante as duas primeiras semanas (fazer a segunda leitura da primeira semana sempre com 7 dias exatos, já que é um parâmetro importante para a identificação posterior) e depois uma vez por semana até completar 8 semanas. Observar o pigmento da colônia.

- Se o meio estiver contaminado com outros microrganismos, desprezar o meio e preparar outra cultura se o material estiver ainda estocado.
- Descontaminar novamente o material antes de inocular no meio.

MIDDLEBROOK 7H10, 7H11

a) Composição: sais, vitaminas, cofatores, ácido oléico, albumina, catalase, glicerol, glicose (7H10), acrescido de hidrolizado de caseína (7H11)

b) Inoculação: semear 0,5 a 1,0mL do sedimento tratado na placa. Utilizar uma alça descartável para espalhar bem todo o material sobre a superfície da placa. Não utilizar a técnica normal de semeadura em placas, semear em todas as direções.

c) Incubação: a 37°C em estufa com 5% a 10% de CO₂ no escuro por até 8 semanas.

d) Leituras: ler duas vezes durante as duas primeiras semanas (fazer a segunda leitura da primeira semana sempre com 7 dias exatos, já que é um parâmetro importante para a identificação posterior) e depois uma vez por semana até completar 8 semanas.

- Os meios sólidos são importantes para observar amostras que possuem mais de um tipo de micobactéria.

MEIOS LÍQUIDOS

MIDDLEBROOK 7H9

a) Composição:

sais, vitaminas, cofatores, albumina, catalase, glicerol

b) Inoculação: inocular a amostra de biópsia ou fragmento de pele diretamente no meio

c) Incubação: incubar a 37°C em estufa contendo 5 a 10% de CO₂. Se forem inoculados fragmentos de pele no meio incubar um tubo a 37°C e outro a 30°C.

d) Leitura: examinar os tubos duas vezes durante as duas primeiras semanas e uma vez nas semanas

seguintes até completar 8 semanas.

BACTEC 12B

Antes de serem inoculados com amostras clínicas ou cepas bacterianas os frascos devem ser colocados no equipamento Bactec 460TB para que sejam inoculados com uma quantidade determinada de CO₂.

a) Composição (Middlebrook 7H12): caldo 7H9, albumina bovina, hidrolizado de caseína, catalase, substrato marcado com ¹⁴C(1μCi/ml).

b) Inoculação: inocular 0,5 ml do sedimento tratado pelo método de NALC, com uma seringa tipo insulina. Adicionar 0,1 ml de uma solução de antibióticos (PANTA, Becton Dickinson) nas amostras que podem apresentar alguma contaminação bacteriana.

c) Incubação: 37°C; amostras de tecidos ou fragmentos de pele devem ser incubados também a 30°C (preparar 2 frascos). Não é necessário incubar no escuro.

d) Leituras: ler 2 vezes nas duas primeiras semanas de incubação e uma vez nas semanas seguintes até completar 6 semanas. Frascos com índices de crescimento (GI) maior que 10 devem ser separadas e testadas diariamente.

- Frascos que apresentarem GI superiores a 10 devem ser considerados como suspeitos de serem positivos, quando o GI chegar a 50 preparar uma lâmina e corar pelo método de Ziehl-Neelsen.
- Algumas vezes pode ser difícil visualizar as micobactérias com um GI tão baixo; aguardar para fazer outra lâmina quando o frasco apresentar um GI maior.
- Algumas vezes o meio 12B não adere bem à lâmina e solta do esfregaço, adicionar uma gota de albumina na lâmina antes de colocar a gota do 12B para fixar o esfregaço.
- Se o frasco apresenta além de bacilos álcool-ácido outras bactérias, descontaminar a amostra diretamente do 12B removendo todo o conteúdo e processando pelo método de 4% de NaOH. Inocular o sedimento tratado novamente em um novo 12B.

BACTEC 13A

a) Composição (Middlebrook 7H13): caldo 7H9, albumina bovina, hidrolizado de caseína, catalase, substrato marcado com ¹⁴C(1μCi/ml), Tween 80, polianetolsulfonato de sódio (SPS).

b) Inoculação: colocar até 5 ml de sangue diretamente no frasco. Adicionar no laboratório 0,5 ml da solução de enriquecimento que vem junto com os frascos Bactec 13A.

c) Incubação: 37°C por até 6 semanas.

d) Leituras: ler os frascos duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 6 semanas.

- Os frascos 13A não necessitam ser passados no Bactec 460 para colocar CO₂, pois estes já vem preparados com a quantidade certa de CO₂.

MGIT

a) Composição: caldo Middlebrook 7H9, sensor fluorescente embebido em silicone sensível ao oxigênio.

b) Inoculação: 0,5 ml do material tratado, adicionar 0,5 ml de OADC (acompanha o kit) e PANTA (solução de antibióticos, Becton Dickinson).

c) Incubação: 37°C.

d) Leituras: realizar a primeira leitura após 48 horas de incubação. Ler duas vezes nas duas primeiras

semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 8 semanas. A leitura é feita com uma luz ultravioleta e a fluorescência emitida é comparada com um controle positivo e negativo.

- Amostras de sangue não devem ser colocadas neste meio.
- Existe disponível um equipamento automatizado (MGIT 960) que realiza as leituras automaticamente.

ESP Myco

a) Composição: caldo Middlebrook 7H9 e esponjas de celulose.

b) Inoculação: 0,5 ml da amostra clínica. São adicionados OADC e uma mistura de antibióticos (MycoPVNA).

c) Incubação: Os frascos são incubados no aparelho ESP Difco por um período de 6 semanas.

d) Leituras: O equipamento automatizado vai realizar as leituras continuamente e medir o consumo e produção de gases.

- Este sistema permite o processamento de qualquer amostra clínica inclusive sangue.

MB/BACT

a) Composição: Middlebrook 7H9, caseína pancreática digerida, catalase, albumina bovina.

b) Inoculação: 0,5 ml do material clínico tratado. Uma mistura de antibióticos é adicionada.

c) Incubação: 37°C no equipamento automatizado MB Bact/Alert por 6 semanas.

d) Leituras: os frascos são lidos automaticamente e constantemente pelo equipamento.

BACTEC MYCO LYTIC

a) Composição: caldo Middlebrook 7H9, sensor fluorescente sensível ao oxigênio.

b) Inoculação: 5 ml da amostra.

c) Incubação: 37°C no equipamento Bactec 9420 durante 42 dias

d) Leituras: o equipamento realiza as leituras e o monitoramento contínuo dos frascos.

- Estes frascos são apenas para processamento de amostras de sangue. Para amostras respiratórias o equipamento usado é o Bactec 9000MB e o frasco é o Myco/F.

CONTROLE DE QUALIDADE

Controle positivo: apresenta crescimento abundante no meio

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177
- *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950
- *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478
- *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841.
- *Mycobacterium scrofulaceum* ATCC 19981

Controle negativo: não apresenta crescimento no meio

- *Escherichia coli* ATCC 25922

Sugestão de meios de cultura, temperatura de incubação e método de processamento de diferentes amostras para isolamento de micobactérias.

Amostra	Inoculação direta	Tratamento da amostra	Meio para isolamento			Temperatura de incubação	
			Lowen Jensen	7H10/ 7H11	Outro	25 a 30°C	37°C
Sangue Medula óssea	X				Bactec 13A, Isolator, Bactec Myco/F Lytic, MB/BacT		X
Amostras respiratórias		X	X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MB/BacT		X
Líquidos	X		X	X	Bactec 12B , ESP Myco/F Lytic, MGIT, MBBacT		X
Líquor	X		X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MB/BacT		X
Tecidos Feridas/Úlceras de pele	X		X	X	Bactec 12B, MGIT, 7H9	X	X
Lavado gástrico		X	X	X	Bactec 12B, MGIT, ESP Myco/F Lytic, MB/BacT		X
Urina		X	X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MB/BacT		X
Fezes		X	X	X	7H11		X
Linfonodos	X		X	X	Meio suplementado com hemina		X

5. IDENTIFICAÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

TESTES BIOQUÍMICOS TRADICIONAIS

CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTO

As micobactérias podem ser separadas em grupos de acordo com, o **tempo de crescimento**, a **temperatura** ótima para que esse crescimento ocorra e a **produção de pigmento** quando exposta à luz.

Estas características podem ser observadas com uma cultura nova em Lowenstein Jensen (LJ), meio usado preferencialmente porque o contraste de cor é mais facilmente observado.

Crescimento

Definido como sendo o tempo necessário para colônias serem visualizadas a olho nú, em meio sólido.

- Micobactérias de crescimento rápido: < 7 dias
- Micobactérias de crescimento lento : > 7 dias

Estudos de crescimento devem ser feitos sempre com uma subcultura diluída para se obter um crescimento de colônias isoladas, nunca em culturas primárias, já que o processo de digestão e descontaminação pode ser muito acentuado levando micobactérias de crescimento rápido a crescerem em até 3 semanas.

<p>a) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Tubos ou Middlebrook 7H9 (caldo).▪ Lowenstein Jensen preparado em tubos com tampa de rosca.	<ul style="list-style-type: none">▪ Com uma pipeta Pasteur estéril transferir 6 gotas do inóculo diluído para 5 tubos de LJ (Lowenstein-Jensen). Distribuir o inóculo por todo o meio.▪ Cobrir 2 tubos com papel de alumínio.
<p>b) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Alças descartáveis estéreis▪ Pipeta Pasteur descartável▪ Papel de alumínio▪ Estufa de CO₂ 37°C▪ Estufa a 30°C e 45°C▪ Homogeneizador▪ Lâmpada 60W	<ul style="list-style-type: none">▪ Incubar, um tubo fechado e um aberto a 25°C (temperatura ambiente), um fechado e um aberto a 37°C. Um tubo deixar aberto a 45°C. Se o material processado for tecido ou material de pele incubar também a 30°C.▪ Manter todos os tubos com as tampas desrosqueadas.
<p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Inocular uma alçada cheia de crescimento em um tubo com caldo 7H9.▪ Homogeneizar vigorosamente por 10 seg.▪ Fazer uma diluição 1:100 deste inóculo.	<p>d) Leituras:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Examinar os tubos após 5 e 7 dias de incubação. Verificar se tem crescimento e classificar conforme descrito na Tabela 5.

Considerar crescimento quando existem colônias bem formadas ou um crescimento confluyente. É importante fazer uma diluição do inóculo, para visualizar colônias isoladas.

Quantidade de crescimento no meio de LJ

Crescimento a 37°C	Quantidade de crescimento		
	1 semana	2 semanas	3 semanas
Rápido	+ a ++		
Intermediário	± a +	++	
Lento	0 a ±	+	++

0 - nenhuma colônia visível no meio

± - algumas poucas colônias muito pequenas ou uma pequena mancha de pigmento visível no meio

+ - várias colônias bem desenvolvidas ou uma fina camada confluenta visível de crescimento no meio, podendo ser visto o meio de LJ embaixo ou entre as colônias

++ - muitas colônias bem desenvolvidas formando uma camada grossa e confluenta de crescimento (colônias tocando umas nas outras ou próximas) sem que se possa ver o meio de LJ embaixo ou entre as colônias.

Pigmento

Variações na produção de pigmento levam a classificar as micobactérias em 3 grupos:

- **fotocromogênicas** - micobactérias que produzem pigmento somente após a exposição à luz.
- **scotocromogênicas** - micobactérias que produzem pigmento tanto no escuro quanto no claro.
- **não fotocromogênicas** - micobactérias que não produzem pigmento em qualquer situação.

a) Procedimento:	b) Resultado:
<ul style="list-style-type: none">▪ Quando houver crescimento no tubo descoberto retirar o papel de alumínio do tubo coberto e verificar se as colônias são pigmentadas.▪ Se não for observado pigmento expor à luz (lâmpada de 60W) por 3 horas (distância do tubo para a lâmpada deve ser de 20 a 25 cm) com a tampa desrosqueada▪ Incubar por mais 3 dias. Manter as tampas desrosqueadas.	<ul style="list-style-type: none">▪ Não pigmentada - cor creme▪ Pigmentada - cor amarelo, laranja claro, laranja <p>(não deve ser observada a intensidade da cor produzida e sim apenas se produz ou não pigmento).</p>

TEMPERATURA

- A temperatura de incubação geral é de 37°C.
- Incubar em diferentes temperaturas quando o material clínico for amostras de pele (25°C a 30°C).
- Algumas micobactérias (*M. xenopi*) crescem melhor quando incubadas 42°C.

TESTE DA CATALASE

A enzima catalase separa o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e o oxigênio aparece na forma de bolhas.

Quase todas as micobactérias produzem catalase, o que vai mudar é a quantidade de catalase produzida ou a perda ou não da capacidade de produzir catalase a 68°C.

Reagentes:10% Tween 80

- Aquecer o Tween 80 e 90 ml de água destilada estéril em banho 50°C.
- Pipetar 10 ml de Tween 80 aquecido nos 90 ml de água destilada estéril aquecida (lavar a pipeta várias vezes para retirar todo o Tween).
- Deixar o frasco no banho até dissolver todo o Tween 80.
- Estocar de 2 a 8°C.

10% Tween 80 / 30% H₂O₂ (solução de uso)

- Misturar partes iguais dos dois reagentes.
- Preparar no momento do uso (1,0 ml/teste).

Não deixar este reagente cair na pele. Em caso de acidente lavar com água corrente.

TESTE SEMI-QUANTITATIVO**a) Meios:**

- 7H9
- Lowenstein Jensen sem inclinação (tubos de 150 mm)

b) Materias e Equipamentos:

- alça descartável
- estufa 37°C
- régua

c) Procedimento:

- Inocular um caldo 7H9 com uma alçada cheia de micobactérias.
- Incubar por 7 dias a 37°C
- Homogeneizar vigorosamente por 10 segundos
- Inocular 0,1 ml do caldo com crescimento em um tubo de LJ preparado sem inclinação.
- Incubar a 37°C por 14 dias com as tampas desrosqueadas.

- Adicionar 1 ml do reagente preparado (Tween 80/H₂O₂) .
- Deixar a temperatura ambiente por 5 minutos e medir a altura das bolhas a partir da superfície do meio de cultura com uma régua.

d) Resultado:

- >45 mm - alta catalase (Ex: *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, etc.)
- < 45mm - baixa catalase (Ex: *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. avium*, etc.)

e) Controles de Qualidade:

- Controle negativo: tubo de LJ não inoculado
- Controle Positivo:
 - catalase alta - *M. fortuitum* ATCC 6841
 - catalase baixa - *M. tuberculosis* ATCC 25177

TESTE A 68°C**a) Reagentes:**

- tampão fosfato (0,067M)

b) Materiais e Equipamentos:

- 2 tubos com tampa de rosca
- alça descartável
- banho maria 68°C

c) Procedimento:

- Inocular um tubo de tampa de rosca com 1,0 ml de tampão fosfato (0,067M) com uma alçada cheia de crescimento de micobactérias.

- Transferir 0,5 ml do inóculo para um segundo tubo de tampa de rosca.
- Incubar um tubo em banho maria a 68°C por 20 min e o outro a temperatura ambiente.
- Adicionar 0,5 ml da solução de Tween 80/H₂O₂ nos dois tubos.
- Deixar a temperatura ambiente por 20 minutos antes de ler. (Não agitar os tubos)

d) Controle de Qualidade:

- *M. tuberculosis* ATCC 25177 - forma bolhas a temperatura ambiente mas não a 68°C.
- *M. fortuitum* ATCC 6841- forma bolhas a temperatura ambiente e a 68°C.

TESTE DA URÉIA

Método Wayne

Teste utilizado para identificar as micobactérias que têm a capacidade de hidrolisar a uréia.

<p>a) Reagentes:</p> <p><u>Caldo Uréia</u></p> <ul style="list-style-type: none">Adicionar 10 g de Bacto Uréia ágar base concentrado (Difco) em 90 ml de H₂O destilada estéril.Homogeneizar bem.Colocar assepticamente 3 ml em tubos com tampa de rosca.Estocar de 2 a 8°C. (validade 1 mês)	<p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">Inocular o caldo uréia com uma alçada cheia de um crescimento de micobactérias.Homogeneizar.Incubar por 3 a 5 dias a 37°C (não passar de 5 dias para fazer a leitura).
<p>b) Materias e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">alça descartávelestufa 37°C	<p>d) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none">Positivo: rosa forte ou vermelhoNegativo: sem mudança de cor. Se ficar levemente rosado repetir o teste, se o resultado persistir, reportar como negativo.

Método Murphy-Hawkins

<p>a) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">água estérilalça descartáveldisco de uréiavermelho de fenolestufa 37°Cvermelho de fenol	<p>c) Resultados:</p> <ul style="list-style-type: none">Positivo: rosa forteNegativo: laranja
<p>b) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">Colocar um disco de uréia em um tubo contendo 0,5 ml de H₂O estéril.Inocular uma alçada cheia de micobactérias com 2 a 4 semanas de incubação no tubo contendo o disco de uréia.Incubar a 37°C por 3 dias.Pingar 1 gota de vermelho de fenol.	<p>d) Controle de Qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none">Positivo: <i>M. kansasii</i> ATCC 12478Negativo: <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950 ou um tubo apenas com meio

CRESCIMENTO EM ÁGAR MACCONKEY SEM CRISTAL VIOLETA

É um teste utilizado para diferenciar as diferentes espécies de micobactérias de crescimento rápido.

a) Meios:

- placa com meio de Mac Conkey sem cristal violeta
- caldo 7H9

b) Materiais e Equipamentos:

- alça descartável
- pipeta Pastuer descartável
- estufa 37°C
- estufa 30°C

c) Procedimento:

- Inocular em um tubo com 7H9 uma alçada do crescimento bacteriano.
- Incubar a 37°C por 1 semana.
- Inocular 3 a 4 gotas do inóculo do caldo 7H9 no ágar MC.
- Estriar a placa.
- Incubar a 28°- 30°C por 11 dias.

d) Resultado:

- Positivo: colônias nas estrias
- Negativo: sem crescimento

e) Controle de Qualidade:

- Controle Positivo: *M. fortuitum*
- Controle Negativo: *M. chelonae*

TESTE DA ARILSULFATASE

Verificar as micobactérias que em diferentes condições produzem a enzima arilsulfatase.

Teste de 3 dias

a) Meios:

- caldo de arilsulfatase (3 dias)

b) Reagentes:

- Na₂CO₃ 2N
- padrões de leitura

c) Materiais e Equipamentos:

- alça descartável
- vortex
- estufa 35°C
- estufa 45°C
- pipeta Pasteur descartável

d) Procedimento:

- Inocular um caldo de 3 dias de Arilsulfatase com uma alçada cheia de micobactérias de uma cultura de 2 a 4 semanas de crescimento.
- Homogeneizar.

- Incubar por 3 dias a 35 - 37°C para micobactérias de crescimento rápido (sem CO₂) e a 45°C quando a suspeita for de *M. xenopi*.
- Após 3 dias colocar 6 gotas de Na₂CO₃ 2N (não mais) com uma pipeta Pasteur.
- Ler comparando com os padrões.

e) Resultado:

- Positivo: produção imediata da cor pink ou vermelha. (Leitura equivalente a +++ do padrão)
- Negativo : incolor

f) Controle de qualidade:

- Positivo: *M. fortuitum*
- Negativo: caldo sem inocular

Teste de 2 semanas

<p>a) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none"> caldo de arilsulfatase (2 semanas) <p>b) Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Na₂CO₃ 2N padrões de leitura <p>c) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> alça descartável vortex estufa 35°C estufa 45°C pipeta Pasteur descartável <p>d) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> Inocular o tubo de arilsulfatase de 2 semanas com uma alçada cheia de micobactérias de uma cultura de 2 a 4 semanas de crescimento. Homogeneizar. 	<ul style="list-style-type: none"> Incubar por 2 semanas a 37°C. Colocar 6 gotas de Na₂CO₃ 2N com uma pipeta Pasteur. Ler comparando com os padrões. <p>e) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: produção imediata de cor rosa forte ou vermelha. (Leitura equivalente a ++++ do padrão) Se o resultado for de +++ (borderline) repetir o teste. <p>f) Controle de qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: <i>M. triviale</i> Negativo: caldo não inoculado ou caldo inoculado com <i>M. tuberculosis</i>.
--	---

TESTE DA REDUÇÃO DO TELURITO

Teste utilizado para verificar se a micobactéria reduz o telurito.

<p>a) Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> telurito de potássio 0,2% <p>b) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none"> caldo 7H9 (preparado em tubo de fundo arredondado) <p>c) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> alça descartável estufa 37°C escala de McFarland (4) pipeta Pasteur descartável vortex <p>d) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> Utilizar uma cultura com 3 a 4 semanas de crescimento. Inocular densamente um tubo de fundo arredondado com caldo 7H9. Homogeneizar bem. 	<ul style="list-style-type: none"> Incubar por 1 semana a 37°C. Verificar se tem crescimento suficiente (equivalente à escala 4 de McFarland). <u>Se não cresceu bem, não incubar novamente e fazer um novo tubo.</u> Com uma pipeta Pasteur colocar 2 gotas de telurito de potássio 0,2% . Agitar no Vortex 30 segundos. Incubar 3 dias a 37°C. Ler após 3 dias (não passar o prazo). <p>e) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: formação de um precipitado preto no fundo do tubo Negativo: não forma precipitado <p>f) Controle de Qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: <i>M. intracellulare</i> Negativo: caldo sem inóculo
--	---

UTILIZAÇÃO DE FERRO

Verificar se a micobactéria é capaz de converter citrato de ferro amoniacal em óxido de ferro.

a) Reagentes:

- citrato férrico amoniacal (solução estéril)

b) Materiais e Equipamentos:

- pipeta Pastuer descartável

c) Procedimento:

- Inocular 2 LJ com uma suspensão de micobactérias.
- Incubar até obter crescimento visível (2 semanas).
- Colocar tantas gotas de citrato férrico amoniacal quantos forem os mililitros de meio em um dos LJ. Ex: para 8 ml de meio LJ, colocar 8 gotas da solução.

- O outro tubo será o controle negativo.
- Reincubar o LJ a temperatura ambiente de 28° - 30°C por até 3 semanas.

d) Resultado:

- Positivo: colônias se tornam escuras-oxidadas
- Negativo: as colônias permanecem com a mesma cor que as do LJ em que não foi colocada a solução.

e) Controle de Qualidade:

- Positivo: *M. fortuitum*
- Negativo: *M. chelonae*

HIDRÓLISE DO TWEEN 80

Esta prova é utilizada verificar a hidrólise enzimática do Tween 80 pelas micobactérias.

a) Reagentes:

- reagente de hidrólise do Tween 80

b) Materiais e Equipamentos:

- alça descartável
- estufa 37°C

c) Procedimento:

- Inocular uma alçada cheia de micobactérias com 2 a 4 semanas de crescimento, em um tubo com o reagente de hidrólise do Tween 80.
- Homogeneizar.
- Incubar a 37°C no escuro com as tampas bem fechadas.
- Ler após 5 e 10 dias de incubação.
- Não agitar os tubos.
- Examinar o líquido e não o sedimento.

d) Resultado:

- Positivo: mudança de cor do meio, de âmbar para pink ou vermelho

e) Controle de Qualidade:

- Positivo: *M. kansasii*
- Negativo: *M. avium*

Se o líquido ficar sem cor repetir o teste, se persistir o resultado reportar como negativo.

TESTES AUTOMATIZADOS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO

IDENTIFICAÇÃO PELO BACTEC 460 - NAP

Princípio

NAP (*p*-nitro- α - acetylamino- β -hydroxypropiofenone) é uma substância que inibe o crescimento de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Outras micobactérias que não estão incluídas neste complexo crescem na presença desta substância.

Na presença de *M. tuberculosis* não há produção de CO₂, derivado do crescimento da micobactéria, o que resulta em uma redução na quantidade de ¹⁴CO₂ produzido, originando um resultado negativo quando o frasco é lido no aparelho Bactec 460TB.

Somente culturas em fase de crescimento devem ser usadas para realizar o teste.

<p>a) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 1 frasco de Bactec 12B▪ 1 frasco NAP <p>b) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Bactec 460TB▪ seringas tipo tuberculina▪ estufa 37°C	<p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Se for utilizado um crescimento de micobactérias no frasco 12B, seguir conforme descrito no anexo C.▪ Se for utilizado um crescimento de micobactérias de um outro meio líquido ou de um meio sólido, colocar um pouco do crescimento da micobactéria em um frasco 12B. Ler diariamente até atingir um GI de 50 - 100 e proceder conforme descrito no anexo C.
---	--

IDENTIFICAÇÃO POR SONDAS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Princípio

As sondas de DNA utilizam uma fita simples de DNA marcada com um éter de acridina complementar ao rRNA do microrganismo alvo. Após a lise das células da micobactéria, o rRNA é liberado e a sonda marcada se combina com esse rRNA formando um complexo sonda + rRNA.

Uma solução hidrolítica é utilizada para inativar o éster que não ligado ao rRNA. O complexo formado é detectado por quimioluminescência com um luminômetro. A quantidade de luz produzida é proporcional a quantidade de complexos sonda + rRNA presentes na amostra.

As sondas comercialmente disponíveis identificam o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium intracellulare* (GenProbe Inc. San Diego, CA).

<p>a) Materiais e Equipamentos:</p>	<p>2. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio sólido:</p>
--	--

- Luminômetro
- sonicador de banho maria
- banho seco 95°C
- seringa de tuberculina
- pipetas automáticas de 100 µL e 300 µL
- banho 60°C

b) Procedimento

1. Se for utilizado crescimento de micobactérias em frasco 12B:

- Utilizar a cultura quando o crescimento atingir um GI de 999.
- Adicionar 100 µL do reagente 1 e 100 µL do reagente 2 em um tubo de lise.
- Ligar todos os banhos para que possam atingir a temperatura adequada antes de começar o teste.
- Retirar 1 ml do crescimento bacteriano e colocar no tubo de lise.
- Vortexar o tubo vigorosamente por 5 minutos
- Sonicar o tubo por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar o tubo no banho a 95°C por 15 minutos.
- Deixar o tubo esfriar a temperatura ambiente
- Retirar 100µL do lisado e transferir para um tubo com a sonda.
- Incubar 15 minutos a 60°C.
- Pipetar 300 µL do reagente 3 (que vem no kit) no tubo.
- Tampar e vortexar.
- Colocar no banho a 60°C * por 5 minutos.
- Retirar do banho, deixar chegar a temperatura ambiente e colocar no luminômetro para fazer a leitura.

* A temperatura do banho de 60°C é crucial para ocorrer o anelamento da sonda com o rRNA da amostra.

- colocar 100µL do reagente 1 e 100µL do reagente 2 no tubo de lise
- inocular uma alçada cheia do crescimento no tubo de lise.
- proceder como descrito acima no item 1.

3. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio líquido:

- somente fazer o teste quando o caldo apresentar uma boa turvação.
- colocar 100 µL do reagente 1 e 100 µL do reagente 2 no tubo de lise
- colocar 1 ml da amostra no tubo de lise
- proceder como descrito acima no item 1.

Nota: O passo mais importante no processo é a lise das células. Após colocar a amostra no tubo de lise, agitar no vortex vigorosamente por aproximadamente 5 minutos para que o processo seja adequando.

d) Resultado:

- Positivo: > 30,000 RLU (Relative Light Units)
- Negativo: < 30,000 RLU

A sonda para o complexo *M. tuberculosis* não identifica as diferentes espécies de micobactérias pertencentes ao complexo.

IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODOS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O termo amplificação significa fazer várias cópias a partir de poucas. Por muito tempo a única técnica em que isso era possível de ser realizado era a cultura, de onde se multiplicava o número de microrganismos presentes na amostra. Esta técnica é muito demorada quando se fala de micobactérias por isso foram desenvolvidas técnicas que amplificam o DNA do microrganismo de forma rápida e específica.

Vários são os métodos para amplificação do DNA de micobactérias que existem no mercado, dentre eles podemos citar; PCR (Polimerase Chain Reaction) e TMA (Transcription-mediated amplification), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) e SDA (Strand Displacement Amplification).

PCR

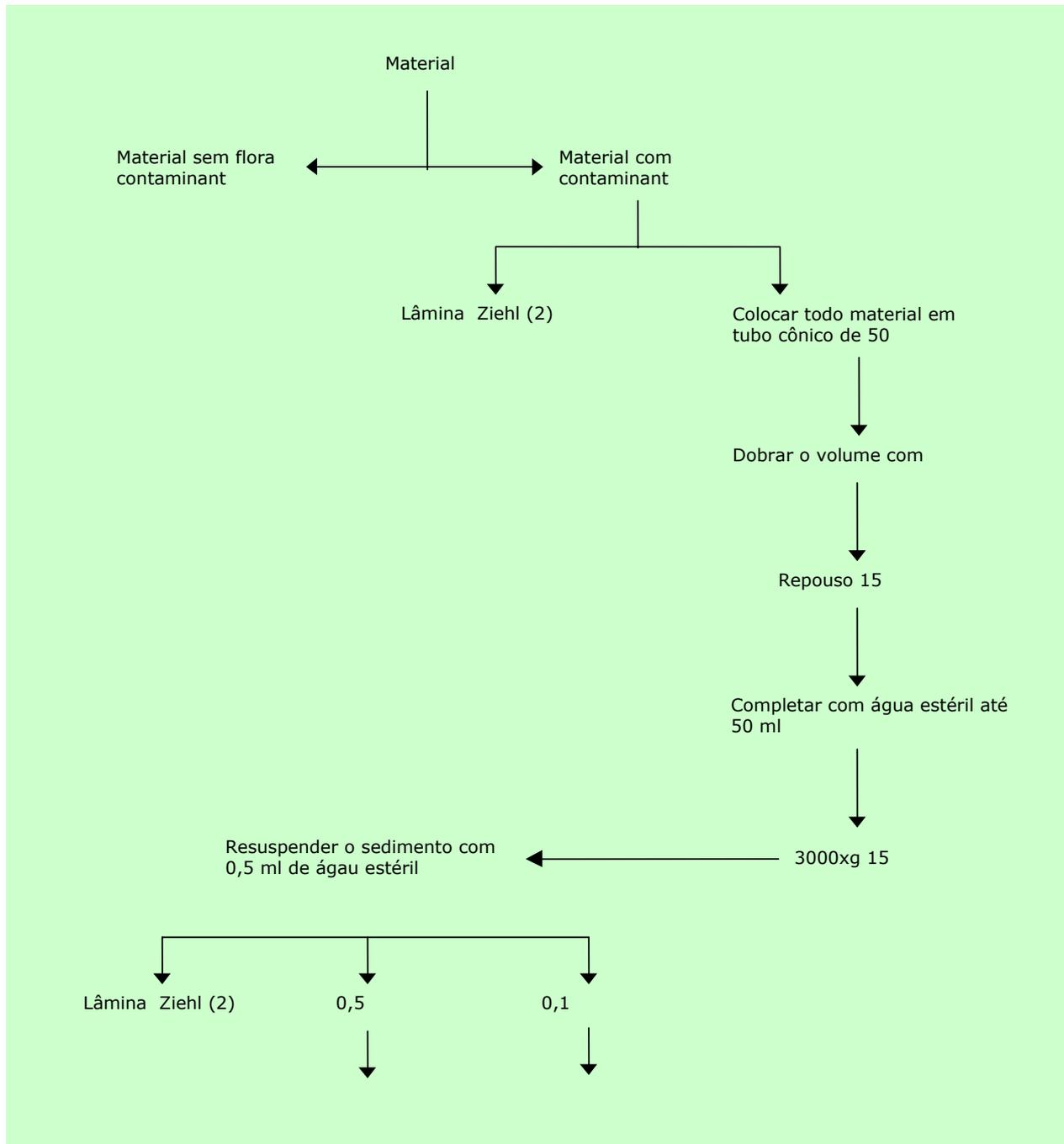
(Amplicor, Roche Diag. Systems)

TMA

Princípio	É um sistema semi-automático de amplificação do DNA "in vitro" por uma série de incubações sucessivas em diferentes temperaturas usando uma enzima estável a temperatura e dependente de DNA (Taq polimerase).	É um sistema semi-automático de amplificação de RNA que utiliza uma única temperatura de amplificação e duas enzimas uma que converte o rRNA em DNA e outra que transcreve o DNA em RNA.
Materiais e Equipamentos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ termociclador ▪ pipetas automáticas ▪ kit AmpliCor 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pipetas automáticas ▪ sonicador ▪ banho 42°C ▪ banho seco 95°C ▪ banho 60°C ▪ luminômetro
Procedimento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A amostra deve ser digerida e descontaminada utilizando o método de NALC-naoh ▪ As células devem ser lisadas e o DNA extraído ▪ O DNA deve ser purificado e concentrado ▪ A técnica de amplificação é aplicada nesse concentrado ▪ O kit possui as soluções e instruções para realizar os passos de extração e amplificação ▪ A detecção do produto amplificado é feita com sondas específicas para o fragmento do DNA amplificado, marcadas com digoxigenina e biotina no formato de uma reação imunoenzimática colorimétrica. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ As amostras devem ser digeridas e descontaminadas pelo método de NALC-NaOH ▪ As células devem ser lisadas e o DNA extraído ▪ A técnica de amplificação é aplicada no DNA extraído ▪ Kit possui as soluções e instruções para realizar os passos de lise, extração e amplificação do DNA ▪ A detecção do produto amplificado é feita com sondas específicas para o fragmento do DNA amplificado, marcadas com um éster de acridina e a leitura é feita em um luminômetro.

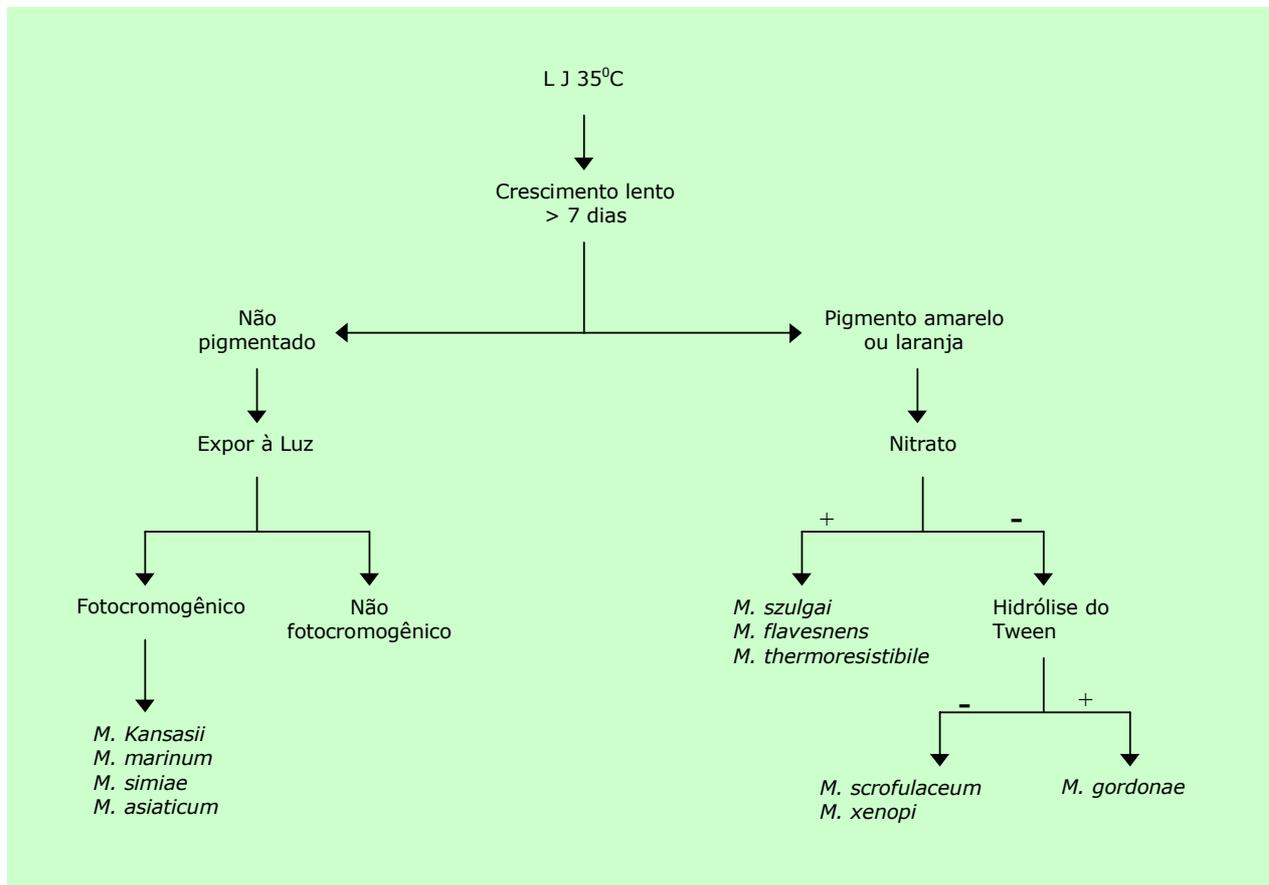
6. ANEXOS

ANEXO A. ESQUEMA DE ISOLAMENTO PRIMÁRIO

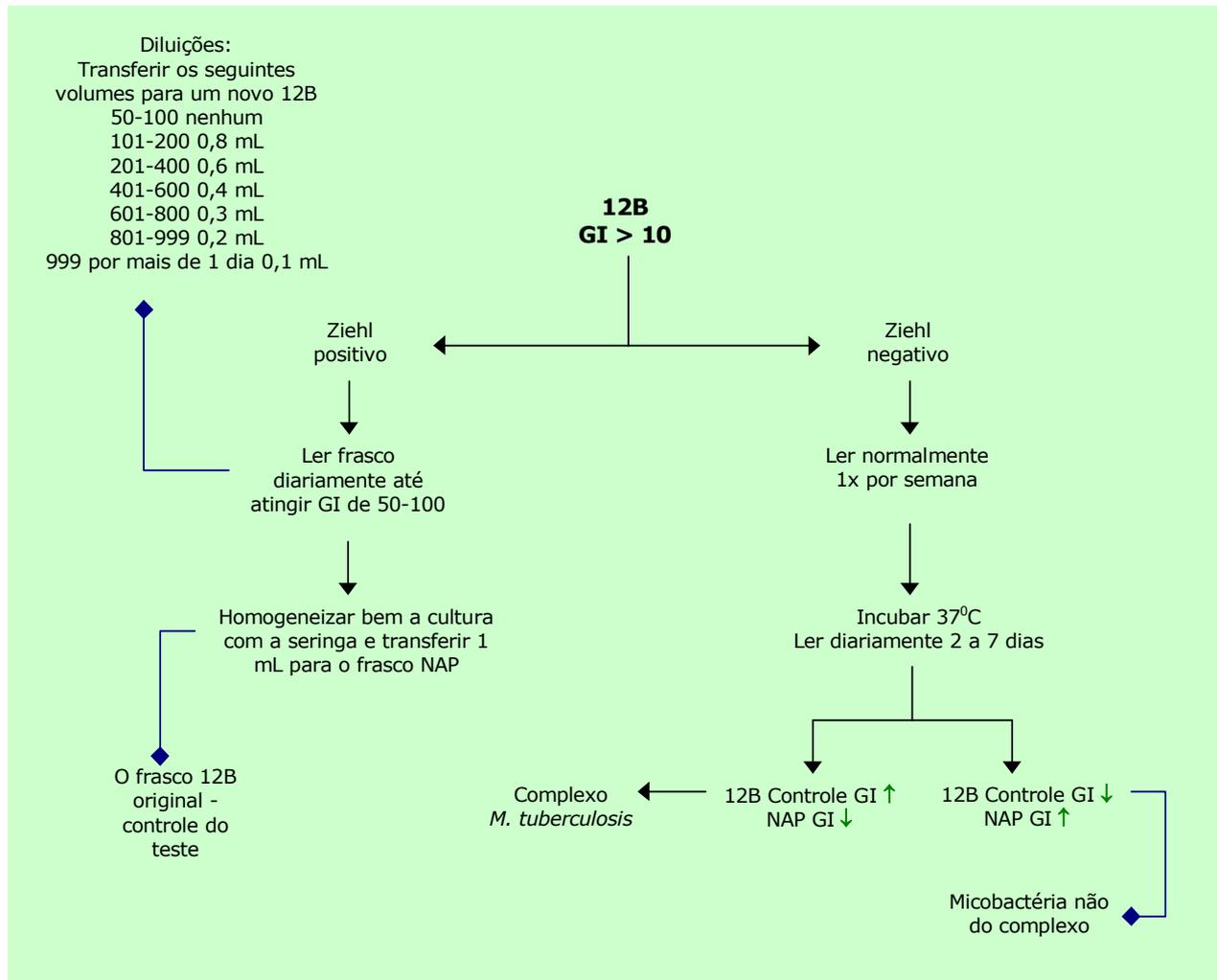


ANEXO B. ESQUEMA DE IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

Crescimento das Micobactéria



ANEXO C. ESQUEMA DO TESTE DE NAP



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Della-Latta, P., Weitzman, I. Mycobacteriology. In: Isenberg, H. D. **Essential Procedures for Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 169-203, 1998.
2. Heifits, L.B. Clinical Mycobacteriology. In: **Clinical in Laboratory Medicine**. W.B. Saunders, Philadelphia, vol 16, no. 3, 1996.
3. Koneman, E.W. Allen, A.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn Jr., W.C. Mycobacteria. In: **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Lippincott, Philadelphia, 5ª ed, 1997.
4. Master, R.N. Mycobacteriology. In: Isenberg, H.D. **Procedures in Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1996.

Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica

Módulo VII

ÍNDICE

1. Introdução	1
Fungos e infecção hospitalar	1
2. Coleta e transporte de amostras	4
Procedimentos para coleta de amostras	4
3. Processamento de amostras	6
Exame microscópico de amostras	6
Cultura de amostras biológicas para isolamento de fungos	8
4. Identificação de fungos	12
Identificação de leveduras	12
Identificação de fungos filamentosos.....	16
Identificação de fungos dimórficos	18
5. Descrição das principais micoses	20
6. Referências bibliográficas	24

GLOSSÁRIO

Artrósporo ou artroconídio = esporo formado pela desarticulação da hifa de fungos filamentosos ou leveduras.

Blastosporo ou blastoconídio = esporos formados por brotamento ou gemulação.

Bolor = fungo filamentoso, multicelular, constituído de hifas.

Brotamento ou gemulação = reprodução com divisão de citoplasma através de estrangulamento.

Cenocítica = hifa desprovida de septos, o mesmo que hifa contínua.

Clamidósporo = estruturas de resistência, constituídas de reserva nutritiva e membrana bastante espessa, permitindo resistir aos fatores externos, semelhante aos esporos.

Conídio = esporo assexuado externo.

Dimórfico = que apresenta duas formas: leveduriforme e filamentosa.

Esporângio = órgão de reprodução assexuada interna, geralmente em forma de vesícula e contém inúmeros esporos denominados de esporangiosporos.

Hialino = que não tem cor, translúcido, assumindo a cor do corante utilizado.

Hifa = reunião de células justapostas, formando estrutura tubular, filamentosa, que compõe o corpo vegetativo dos bolores e de alguns gêneros de leveduras (por ex, *Candida* spp.).

Demácio ou demaciáceo = fungos negros que têm pigmento melanóide (acastanhado), na parede celular.

Levedura = fungo em regra, unicelular que se reproduz geralmente por brotamento.

Tuberculado = com granulações ou nodosidades.

1. INTRODUÇÃO

FUNGOS E INFECÇÃO HOSPITALAR

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos. Leveduras são fungos capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. De modo contrário, fungos filamentosos, ou bolores, normalmente, não fazem parte da microbiota animal e portanto o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos. As portas de entrada no hospedeiro são as vias aéreas superiores ou quebra na barreira epidérmica após traumatismos com objetos perfuro-cortantes.

Dentre as centenas de espécies descritas, leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Hospitais norte-americanos com sistema de vigilância operante, notificaram *Candida* como 6º patógeno nosocomial e a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais.

A manifestação clínica mais comum nas candidíases hospitalares é febre. Candidemia pode ser definida como a ocorrência de 2, ou mais, culturas positivas para a mesma espécie de *Candida*, provenientes de amostras diferentes, coletadas após 72 h da admissão. Infecção invasiva por *Candida* pode ser também considerada quando há isolamento de *Candida* a partir de sítio normalmente, estéril associado a pelo menos, um outro sinal de infecção. A sensibilidade de hemocultura para *Candida* é baixa; aproximadamente, 50% dos pacientes com infecção invasiva por *Candida* podem ter culturas negativas. Além disso, se houver infecção bacteriana concomitante, pode diminuir a chance do isolamento de *Candida*.

Os fatores reconhecidos de risco para infecção invasiva por *Candida* são:

- Permanência > 4 dias em UTI
- Antibioticoterapia de largo espectro
- Cirurgia abdominal
- Cateterização venosa central
- Nutrição parenteral total
- Imunodepressão
- Índice APACHE II > 10
- Ventilação mecânica > 48h
- Neutropenia
- Quimioterapia citotóxica

Frente a estas condições recomenda-se monitoração com exames micológicos sangue de amostras biológicas dos pacientes, tais como, sangue, escarro, pontas de catéteres intravasculares, líquido peritoneal e urina. Culturas positivas para leveduras podem significar apenas colonização mas, podem conduzir à doença invasiva subsequente. Estudo prospectivo, em pacientes cirúrgicos de UTI, mostrou que 38% de 29 pacientes desenvolveram infecção após colonização. A colonização pode ser demonstrada por análise de 3 ou mais amostras, coletadas do mesmo local ou de sítios diferentes, do mesmo paciente, em dias consecutivos.

Diferentes espécies de *Candida* podem causar quadros de fungemia, a saber: *Candida glabrata* (*Torulopsis glabrata*), *Candida tropicalis*; *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida lipolytica*, *Candida kefyr*, *Candida inconspicua*, *Candida norvergensis* e *Candida catenulata*. Um grupo europeu realizou na década de 90 um estudo multicêntrico e, por análise univariada, concluíram ser *C. glabrata*, a espécie associada à maior taxa de mortalidade e que óbito estava relacionado com maior idade e severidade da doença de base do paciente.

O gênero *Candida* é, sem dúvida o mais importante mas, existem outras leveduras no ambiente hospitalar, tanto em vegetais, ar atmosférico e água, quanto na pele e no trato gastrointestinal dos pacientes e funcionários, que podem causar quadros infecciosos. Os principais gêneros são *Pichia sp* (*Hansenula sp*), *Rhodotorula sp* e *Trichosporon sp*.

Fungos filamentosos presentes no meio ambiente hospitalar, também podem causar infecção em pacientes suscetíveis. O gênero *Aspergillus sp* (*Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) é o mais citado na literatura como fungo oportunista, especialmente em pacientes transplantados de medula óssea e neutropênicos. A inalação de esporos é a via mais comum de transmissão e os surtos de aspergilose são associados a reformas e construções, dentro e ao redor de hospitais. Doença pulmonar e, mais raramente, sinusite, são as manifestações de aspergilose. Outros gêneros, tais como *Fusarium sp*, *Acremonium sp* e *Penicillium sp* são capazes de causar formas localizadas ou disseminadas de infecção hospitalar. Estes gêneros que são dispersos pelo ar atmosférico, pertencem ao grupo dos hialohifomicetos, pois têm hifas hialinas e septadas. Outros grupos de fungos filamentosos, como zigomicetos (*Rhizopus sp*, *Mucor sp*), caracterizados por hifas não-septadas (cenocíticas) e alguns feo-hifomicetos ("fungos negros" ou demácios) que têm hifas amarronzadas, podem também ser agentes de infecção hospitalar.

GENERALIDADES SOBRE FUNGOS

Os fungos de interesse médico, agentes de micoses, são de dois tipos morfológicos: leveduras, que são unicelulares e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares (Fig.1). Existe um subgrupo dentro dos filamentosos, chamados fungos dimórficos, que se apresentam sob ambas as formas, dependendo principalmente da temperatura, mas sob influência também do teor de CO₂ e condições nutricionais.

As leveduras têm como estrutura primária, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral, de forma arredondada. Estas células são esporos de origem assexual e se denominam blastocônídios. Alguns gêneros de leveduras menos importantes em micologia médica, reproduzem-se por fissão.

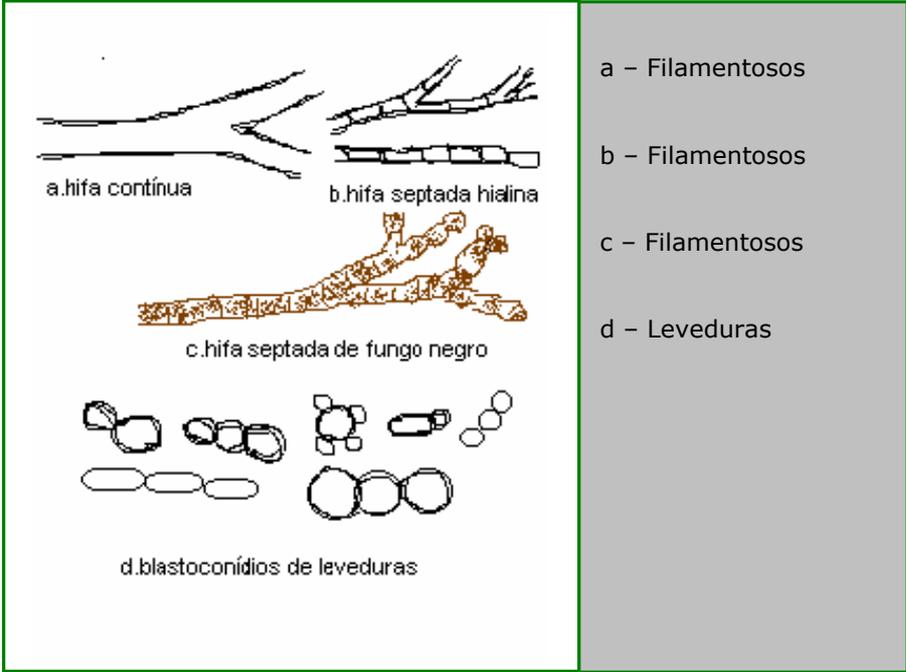
Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada (cenocítica). A partir da hifa formam-se esporos, para propagação das espécies. Na grande maioria dos fungos, os esporos podem ser chamados de conídios, pois nascem diretamente delas ou sobre estruturas ligas a elas.

Esses conceitos fundamentais representam a base para a identificação de um fungo, pois a classificação de filamentosos é feita, em regra, pelas características morfológicas, tanto macroscópicas (cor, aspecto, textura da colônia, etc.), quanto microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos, etc.), além da velocidade de crescimento (lenta, moderada ou rápida). A identificação de leveduras, ao contrário, é feita, principalmente, por características fisiológicas, desde que, a morfologia destes fungos não é muito variada e não permite distinção entre espécies e, em regra, entre gêneros.

Com o advento da terapia com antibióticos de largo espectro e o tratamento de pacientes com doenças metabólicas crônicas, neoplásicos e transplantados, em uso de agentes citotóxicos e imunossupressores, além da AIDS, a diferença entre fungos contaminantes e patogênicos (classicamente os agentes de micoses superficiais, subcutâneas e profundas), tornou-se pouco clara. Agentes como *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e espécies de zigomicetos, considerados antigamente, como contaminantes de laboratório e, portanto, de pouca importância clínica, são agora conhecidos como causadores de enfermidades disseminadas, endocardites, infecções pulmonares, ceratites entre outras, em pacientes imunodeprimidos. Portanto, estes fungos devem ser considerados, além dos patógenos clássicos, como por ex., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, como possíveis agentes de quadros infecciosos.

Neste módulo, será apresentada uma visão geral das principais infecções fúngicas, de modo que, os microbiologistas possam adquirir certa habilidade para identificar fungos isolados de amostras biológicas. Para um estudo mais completo sobre diagnóstico de infecções fúngicas, recomenda-se as referências citadas ao final do capítulo.

Estruturas microscópicas básicas de fungos: a, b, c - filamentosos, d - leveduras



2. COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

O tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, são fatores importantes no sucesso do isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico de infecções fúngicas.

A amostra deve ser submetida ao exame microscópico direto e cultura em meios para isolamento e identificação acurada do agente etiológico. Por isso, a assepsia na coleta e o volume da amostra são fatores básicos para o sucesso do diagnóstico da infecção.

RECOMENDAÇÕES GERAIS DE COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

- Coletar a amostra biológica com assepsia e colocá-la em recipiente estéril e vedado, sempre em quantidade suficiente (≥ 2 ml ou $0,5$ cm³) para permitir todos os procedimentos laboratoriais necessários.
- Os "swabs" usados para coleta de material de ouvido, nasofaringe e orofaringe, secreção vaginal e lesões abertas, devem ser colocados em tubos contendo salina estéril para o transporte, de modo a evitar a dessecação da amostra.
- Sempre que possível, coletar amostras antes do início da terapia específica e, particularmente, para lesões cutâneas de pele e unhas, orientar o paciente para evitar uso de medicação tópica por 4 a 5 dias antes da coleta de escamas.
- A amostra deve ser identificada com nome do paciente, número de registro hospitalar (quando for o caso), tipo de amostra e data da coleta.
- A requisição médica que acompanha a amostra, deve conter, sempre que possível, as hipóteses diagnósticas que auxiliarão o micologista na escolha da coloração e do meio de cultura mais adequado para o isolamento do agente etiológico.
- Em pacientes imunodeprimidos ou muito debilitados o estudo de um mesmo tipo de amostra biológica, coletada em 2 ou 3 dias consecutivos, é importante para a interpretação correta de resultados positivos para fungos considerados como saprófitas, ou seja, contaminantes do meio ambiente, ou mesmo, constituinte da microbiota normal do paciente. Nestes pacientes, os fungos saprófitas podem se tornar oportunistas e comportarem-se como patógenos.
- Os materiais ditos contaminados, tais como urina, fezes, pús, secreções de feridas ou trato respiratório, devem ser enviados, sob gelo, ao laboratório, o mais rápido possível (<2 h).
- Líquor e líquidos cavitários devem ser mantidos à temperatura ambiente e encaminhados com urgência ao laboratório para processamento imediato.
- Sangue e material de punção de medula óssea são os únicos materiais biológicos que devem ser semeados diretamente, em frascos contendo meio de cultura líquido ou bifásico (líquido sobre sólido), de modo a evitar coagulação e conseqüente diminuição da sensibilidade do exame.

PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE AMOSTRAS

Escarro	Recolher, de preferência, a primeira expectoração da manhã, após gargarejo com água limpa ou fervida, em frasco de boca larga, esterilizado. Não deve conter saliva.
Aspirado gástrico	Aspirar cerca de 5 a 10 ml de suco gástrico, através de sonda nasogástrica, pela manhã, em jejum.
Aspirado traqueal e secreção obtida por broncoscopia	Procedimento realizado por médico treinado. O material colhido deve ser colocado em recipiente estéril.
Sangue e aspirado de medula óssea	Fazer assepsia rigorosa no local da punção e coletar cerca de 5 a 6 ml de sangue venoso, que deverá ser injetado diretamente, em frasco contendo meio de cultura (ver detalhes no próximo ítem). A última gota de material deve ser distendida em uma lâmina de microscopia, para coloração de Giemsa.

Líquor	Fazer assepsia rigorosa no local da punção. Coletar 2 ml ou mais, para exame microscópico e cultura para fungos. Os tubos na rotina hospitalar, devem ser usados na seguinte sequência: 1º exame bioquímico, 2º exame de celularidade, 3º microbiológico, reduzindo assim a possibilidade de isolamento de contaminantes da pele. Entretanto, a coleta da amostra em tubos específicos para cada um desses exames, aumenta a sensibilidade do exame micológico e, por isso, deve ser recomendada.
Tecido obtido por biópsia, necrópsia e peças operatórias	Colher assepticamente, utilizando instrumentos estéreis e colocar o material em recipiente estéril, com salina. Não adicionar nenhum líquido fixador.
Urina	A amostra biológica mais apropriada para o diagnóstico de micose do trato urinário é obtida por sondagem ou citoscopia. Quando não for possível, e para evitar contaminação com microrganismos presentes nas áreas vizinhas, fazer limpeza prévia da região perineal com água e sabão, desprezar o primeiro jato de urina da manhã, e colher 3 a 5 ml de urina em tubo de ensaio estéril. Coleções de 24 horas, não têm valor para diagnóstico micológico.
Fezes	Fazer lavagem prévia da região anal com água e sabão, coletar porções de fezes em recipiente estéril com tampa ou "swab" anal, mergulhar o "swab" em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Secreção ou pele de conduto auditivo externo	Colher material por curetagem da lesão ou com "swab" estéril. Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Material de micose ocular	O melhor método para recuperação de fungos, requer raspado de córnea, aspiração de líquido intra-ocular ou biópsia. A coleta com auxílio de "swab" não é indicada em local de drenagem.
Lesão de nariz e seios paranasais	Coletar secreção, material necrótico ou tecido obtido por biópsia em recipiente estéril.
Mucosa oral e orofaringe	Coletar com "swab" estéril o material de lesão de mucosa jugal, papilas linguais ou região tonsilar. Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Secreção vaginal	Com auxílio de espéculo, coletar material da lesão ou do fundo de saco vaginal com "swab" estéril. Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Líquidos corporais (pleural, ascítico, pericárdico, sinovial)	Fazer assepsia rigorosa no local da punção. Coletar cerca de 5 a 10mL de líquido em tubo de ensaio estéril.
Pus e material de abscesso	Devem ser colhidos de preferência, por aspiração de abscessos fechados, com seringa e agulha estéril. Se a lesão for aberta, limpar o local, com gaze esterilizada embebida em salina estéril, para eliminar os exsudatos superficiais que são altamente, contaminados com bactérias. A seguir, colher o material com "swab". Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Pele e pelos	Se possível, descontaminar a pele com álcool 70% antes da coleta. Raspar com lâmina de bisturi as escamas cutâneas da borda das lesões. Pode-se utilizar também, uma lâmina de microscopia. Colocar o material entre duas lâminas limpas, de preferência esterilizadas, vedando-se as bordas das lâminas com fita adesiva para evitar perda do material. Os pelos tonsurados, devem ser retirados com pinça estéril e acondicionados entre lâminas ou em potes, de preferência esterilizados.
Unhas	Fazer limpeza prévia das unhas, escovando com água e sabão. Cortar com tesoura e desprezar a parte descolada da unha e, com lâmina de bisturi, raspar as áreas mais profundas e pulverulentas. Colocar este material entre lâminas e vedá-las com fita adesiva.

3. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

O sucesso na visualização e isolamento do agente etiológico depende, além da coleta e transporte adequados e volume suficiente da amostra, de seu processamento correto antes do exame micológico. As seguintes recomendações devem ser cuidadosamente, seguidas para boa resolução diagnóstica:

- **Pelos, cabelos, escamas de unha e pele** devem ser alíquotadas para exame microscópico e cultura pois, para exame são clarificadas com solução aquosa de KOH a 20% e, para cultura, não podem sofrer nenhum tratamento prévio, sendo por isso, inoculadas diretamente na superfície do meio de cultura.
- **Líquor, secreções e fluídos corporais** (líquido pleural, ascítico, sinovial, pericárdico, aspirado transtraqueal, lavado gástrico e broncoalveolar [BAL]) devem ser concentrados por centrifugação (1500 a 2000 rpm por 10 minutos). Os materiais coletados com "swabs" devem ser eluídos em solução salina e também devem ser centrifugados. O sedimento obtido é o material adequado para o exame microscópico e semeadura em meios de cultura.
- Para **urina**, é recomendável que uma alíquota (alça calibrada) seja semeada, por esgotamento, sobre o meio de cultura distribuído em placa de Petri, para exame quantitativo, pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A outra alíquota deve ser centrifugada (1500 a 2000 rpm por 10 minutos) e o sedimento será utilizado para exame microscópico e nova semeadura em tubo (cultura qualitativa).
- **Escarro** pode ser digerido com enzima (v/v) N-acetil-L-cisteína (250 mg de enzima dissolvidas em 1 L de solução-tampão citrato ou solução fisiológica), que fluidifica e facilita a manipulação da amostra e formação de sedimento após centrifugação. Porém, não foi comprovado que esse tratamento melhora a recuperação de fungos da amostra sendo, portanto, opcional. Pode-se utilizar, como alternativa, para digestão da amostra, solução de KOH 20%. A porção purulenta da amostra é preferível e porções líquuefeitas não são adequadas para isolamento do agente. A porção da amostra tratada com KOH, porém, só pode ser usada para exame microscópico, pois a potassa destrói, após algumas horas, as estruturas do fungo, inviabilizando seu isolamento em meio de cultura. Neste caso, outra porção da amostra deve ser centrifugada e o sedimento usado para cultura.
- **Tecidos** obtidos por **biópsia** requerem fragmentação, com o auxílio de um bisturi estéril ou maceração (gânglio) com pistilo em almofariz; pode ser feito dentro de uma placa de Petri estéril. Esse procedimento visa aumentar a área de superfície e expor o microrganismo ligado ao tecido, ao maior contato com o meio de cultura.
- **Sangue e aspirado de medula óssea** não necessitam preparação, sendo que o exame microscópico tem baixa sensibilidade e, portanto a cultura é importante para identificação do agente. Para cultura, as amostras são semeadas imediatamente, após a coleta, em frascos contendo meio de cultura. O meio pode ser bifásico (15 ml de ágar inclinado sob 50 ml de caldo) composto de infusão de cérebro-coração (meio BHI) ou Sabouraud. Meios contendo saponina para lise e posterior centrifugação da amostra são indicados. Na prática, frascos para hemocultura bacteriológica (simples ou automatizada), proporcionam isolamento adequado de fungos, desde que respeitado os períodos necessários ao seu desenvolvimento. Para fungos dimórficos, de crescimento lento (>15 d), muitos autores consideram o método de lise-centrifugação o mais sensível. O sangue e medula óssea não devem ser coletados em seringas contendo EDTA, pois esta substância se combina com elementos da parede dos fungos, diminuindo a sensibilidade do exame. Um dos procedimentos recomendados para é a inoculação de 5 a 6 ml da amostra no frasco com meio bifásico sendo, uma parte para 10 partes do meio líquido, que deve ser então, incubado à temperatura de 30°C.

EXAME MICROSCÓPICO DE AMOSTRAS

A observação de um fungo na amostra biológica tem grande valor diagnóstico pois demonstra a invasão do fungo no tecido e permite uma informação imediata ao médico, a qual pode ser crucial para determinar a terapia apropriada ao paciente. No entanto, se a quantidade da amostra biológica for insuficiente para o exame microscópico e cultura do material, a cultura, na maioria das amostras, tem prioridade sobre o exame microscópico, desde que é método mais específico e em muitos casos, mais sensível. O exame microscópico da amostra é realizado por várias técnicas, dependendo do tipo da amostra e suspeita clínica.

EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) A 20%

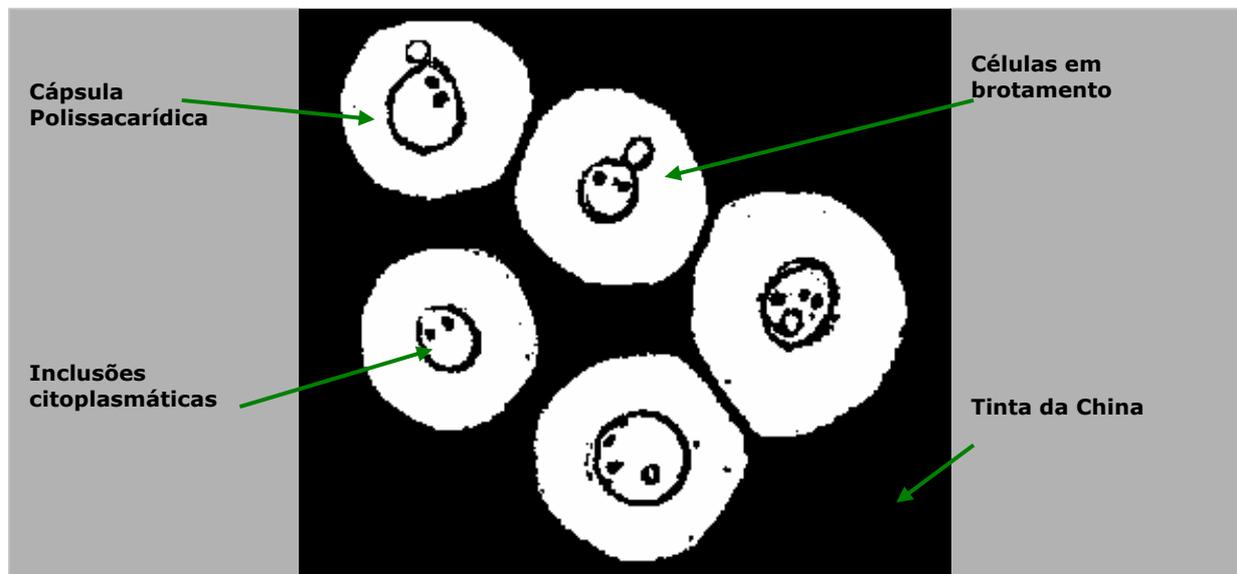
É usado para exame de pelos, pele, unha, tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos. Colocar uma gota de KOH (aquoso a 20%) em uma lâmina de microscopia e sobre esta, uma porção da amostra a ser examinada. Cobrir a preparação com uma lamínula e, para intensificar a clarificação, aquecer ligeiramente, sobre a chama de um bico de Bunsen, sem deixar ferver a mistura. Examinar a preparação após 20 minutos, em microscópio óptico comum, inicialmente, com objetiva de 10x, seguida de 40x.

EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM TINTA NANQUIM (TINTA DA CHINA)

Utilizada em amostras de líquido, urina, secreções ou exsudatos, para visualização de leveduras capsuladas do gênero **Cryptococcus**, que se tornam mais evidentes contra o fundo negro proporcionado pela tinta.

Colocar uma gota de tinta nanquim e uma gota do sedimento da amostra centrifugada, sobre uma lâmina. Cobrir a preparação com lamínula e observar ao microscópio óptico (objetivas de 10x e 40 x). Nesta técnica, um erro bastante frequente é confundir linfócitos com células de leveduras. A diferenciação é feita pela refringência da parede celular e das inclusões no citoplasma das leveduras, além da presença de brotamentos.

Cryptococcus sp: leveduras em brotamento rodeadas de halo transparente (cápsula polissacarídica), sobre fundo negro formado pela tinta nanquim



EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

Todos os fungos são Gram- positivos, assim a utilização da coloração não visa a diferenciação dos microrganismos, mas possibilita discriminar elementos fúngicos de artefatos existentes em urina, secreções e fezes. A amostra é espalhada de modo homogêneo, em movimentos circulares, em uma lâmina de microscopia, fixada com calor e submetida à coloração.

EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PANÓTICA (GIEMSA, LEISHMAN OU WRIGHT)

Estas colorações são usadas para pesquisa de *Histoplasma capsulatum* em diversas amostras biológicas: medula óssea, sangue, aspirados e secreção cutânea. Nestes casos, faz-se um esfregaço semelhante ao usado para coloração de Gram. Fixa-se com metanol e cora-se segundo o método escolhido. Podem ser usadas ainda, para corar "imprints" de tecidos obtidos por biópsia.

Abaixo estão esquematizados os principais aspectos morfológicos observados ao exame microscópico e os possíveis agentes etiológicos de acordo com a amostra biológica.

Interpretação de aspectos morfológicos encontrados em exames microscópicos de amostras biológicas

Amostra biológica	Aspecto Morfológico	Interpretação
Pelos	a. Hifas hialinas e/ou artrosporos (1)	a. Dermatófitos
Unhas, escamas de pele	a. Hifas regulares, septadas, ramificadas, hialinas, artrosporadas (1) b. Leveduras e pseudohifas c. Grupo de leveduras e/ou pequenas hifas tortuosas, hialinas (1)	a. Dermatófitos b. <i>Candida spp</i> c. <i>Malassezia sp</i>
Líquor	a. Levedura capsulada (2)	a. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i>
Secreções (trato respiratório, vaginal, nasal, oral, naso-faringe)	a. Hifas ramificadas, hialinas, septadas (3) b. Levedura capsulada (2) c. Levedura e pseudohifa (1,3) d. Leveduras globosas ou multiformes, de parede espessa, inclusões citoplasmáticas, com múltiplos brotamentos (1)	a. Fungos filamentosos hialinos (5) b. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> c. <i>Candida spp</i> d. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Tecidos, pus e aspirados (subcutâneo, ganglionar, cerebral, pulmonar, mucosa ou outro)	a. Hifas irregulares, largas, cenocíticas (1,3) b. Hifas ramificadas, hialinas, septadas (1,3) c. Hifas septadas de cor castanha ou marrom (1,3) d. Estruturas ovaladas, com ou sem septos, de cor castanha (estruturas muriformes) (1) e. Levedura e pseudohifa (1,2) f. Levedura capsulada (2) g. Levedura globosa ou ovóide, de parede espessa, inclusões citoplasmáticas, com brotamento único ou múltiplos (1) h. Leveduras pequenas, tipo charuto (achado muito raro) (3) i. Leveduras pequenas em macrófagos (4)	a. Zigomicetos b. Fungos filamentosos hialinos(5) c. Feohifomicetos (fungos demácios) d. Cromomicetos (agentes de cromomicrose) e. <i>Candida spp</i> f. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> g. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> h. <i>Sporothrix schenckii</i> i. <i>Histoplasma capsulatum</i>
Fluídos oculares	a. Fragmentos de hifas, hialinas, septadas (1,3) b. Leveduras e pseudohifas (1,3)	a. Fungos filamentosos hialinos (5) b. <i>Candida spp</i>
Sangue e medula óssea	a. Fragmentos de hifas ramificadas, hialinas, septadas (3,4) b. Levedura capsulada (2) c. Leveduras em brotamento (3,4) d. Leveduras pequenas em macrófagos (4)	a. Fungos filamentosos (5) b. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> c. Leveduras (6) d. <i>Histoplasma capsulatum</i>

(1) Exame microscópico com KOH

(2) Exame microscópico com tinta nanquim

(3) Exame microscópico com coloração de Gram

(4) Exame microscópico com coloração de Giemsa ou panótica

(5) São fungos saprófitas que podem se tornar oportunistas, por ex. ***Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium***, cuja identificação só é possível pela cultura.

(6) No sangue, leveduras do genero ***Candida*** não formam pseudohifas e a identificação de gênero e espécie é possível somente, após isolamento em meio de cultura.

CULTURA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS

A amostra, após o processamento, poderá ser usada para isolamento do agente etiológico. Para tanto, deverá ser semeada em movimentos de estrias (zig-zag) sobre a superfície de meios sólidos de cultura, distribuídos em alíquotas de 12 a 20 ml, dentro de tubos de ensaio tamponados com tampão hidrófilo.

MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados para o isolamento primário de fungos, a partir de amostras biológicas, podem ser adquiridos no comércio, sob a forma desidratada, não precisando ser formulados no laboratório. Após a hidratação, conforme instruções do fabricante, o meio deve ser distribuído, de preferência, em tubos e esterilizados por autoclavação.

Para ágar, recomenda-se a solidificação com tubo inclinado, deixando espaço de 3 cm do final do meio até o tampão, para evitar contaminação via meio externo. Todos estes meios de cultura são distribuídos e esterilizados, de preferência em tubos de ensaio pois, desta forma, há maior resistência à desidratação e contaminação, além de oferecer menor bio-risco na manipulação da cultura.

O armazenamento dos tubos, contendo meios de cultura, deve ser em saco plástico fechado, dentro de armários, à temperatura ambiente. Desse modo, se houver uma contaminação durante o tempo de armazenamento, as colônias de fungos contaminantes serão facilmente observadas, ao contrário do que ocorre, quando se armazena sob refrigeração. O controle de esterilidade deve ser feito por 7 dias, à temperatura ambiente, antes do uso de qualquer meio de cultura.

Para isolamento de fungos a partir de qualquer tipo de amostra, devem ser utilizados **meios não seletivos**, que permitam crescimento de fungos patogênicos e bolores de crescimento rápido (\leq de 7 dias). Estes fungos, apesar de serem contaminantes de meio ambiente, podem ser agentes de micoses em pacientes suscetíveis, ou seja, são potencialmente, oportunistas. O isolamento desses fungos, em meio de cultura está sendo, cada vez mais, importante para diagnóstico laboratorial das infecções ditas oportunistas.

O meio básico em laboratório de micologia é o ágar Sabouraud dextrose (ASD), chamado simplesmente, ágar Sabouraud. Em regra, usa-se um antibiótico para impedir o crescimento de bactérias que poderiam prejudicar o isolamento de fungos. O cloranfenicol é o mais indicado, pois resiste à autoclavação. Pode ser colocado tanto no ASD como em outros meios de cultura para fungos.

Meios ditos seletivos para fungos patogênicos, contém cicloheximida que inibe parcialmente, ou totalmente, fungos anemófilos. Estes meios são indicados para cultivo de materiais coletados de lesões com suspeita de dermatofitose, para aumentar a sensibilidade no isolamento de dermatófitos. Mas, deve-se ressaltar que esta substância poderá inibir o isolamento de fungos oportunistas, como ***Aspergillus sp***, além de ***Histoplasma capsulatum*** na fase leveduriforme e certas leveduras patogênicas dos gêneros ***Candida*** e ***Cryptococcus***.

Existem meios presuntivos que indicam presença de certos grupos de fungos ou determinados gêneros, como por ex., ágar contendo compostos fenólicos para ***Cryptococcus sp*** (ágar contendo sementes de niger ou *Guizzotia absinica*), ou ágar especial para dermatófitos (*Dermatophyte Test Medium*). Existem ainda, meios presuntivos, por reação enzimática e colorimétrica, de espécies de *Candida spp* (*Candida Medium*, *ChromAgar*, *Biggy Agar*, etc). São meios mais caros que ASD e além disso, sua maior aplicação é no isolamento primário de leveduras, a partir de amostras biológicas muito contaminadas, tais como: secreção vaginal, fezes e urina. A identificação, no entanto, é feita somente, após análise morfológica e fisiológica.

Para isolamento ou subcultivo de dermatófitos recomenda-se o ágar batata, encontrado no comércio, sob forma desidratada, para aumentar a esporulação e facilitar a identificação do gênero e espécie do fungo. Para fungos dimórficos, de crescimento lento (\geq 15 dias), recomenda-se o uso de meios enriquecidos como o ágar infusão de cérebro-coração (BHI) para obtenção, em menor tempo, de culturas melhor desenvolvidas. Pode ser acrescido de 5 a 10% de sangue de carneiro e de antibióticos (de preferência, cloranfenicol ou penicilina e estreptomicina).

O meio de cultura pode ser selecionado segundo: tipo de amostra e agente etiológico, conforme a suspeita clínica. De acordo com os aspectos observados ao exame microscópico da amostra, pode-se ainda, redirecionar o procedimento para isolamento do agente. Recomenda-se sempre 2 tubos de meio para sementeira da amostra biológica, os quais deverão ser incubados à temperatura de 30°C, usada atualmente, para todos os tipos de amostras.

ÁGAR SABOURAUD-DEXTROSE (ASD)

Dextrose	40 g
Peptona	10 g
Ágar	15 g
água destilada	1000 ml

- Dissolver os componentes na água destilada.
- Acertar o pH em 5,6 .
- Aquecer até a completa dissolução.
- Distribuir cerca de 10 ml por tubo.
- Esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

ÁGAR SABOURAUD-DEXTROSE COM CLORANFENICOL

- Dissolver 100 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização.

ÁGAR-SABOURAUD-DEXTROSE COM CLORANFENICOL E CICLOHEXIMIDA (MEIOS COMERCIAIS MYCOSEL, MICBIOTIC AGAR OU MEIO SELETIVO PARA FUNGOS)

- Diluir separadamente 400 mg de cicloheximida (Actidione) em 10 ml de acetona.
- Diluir 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Misturar as soluções e adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização.
- pH= 7,0

BRAIN HEART INFUSION AGAR COM CLORANFENICOL (BHI)

- Dissolver 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Adicionar em 1 litro de BHI desidratado antes da esterilização.

PROCEDIMENTOS PARA CULTURA

Os materiais devidamente, processados devem ser semeados na superfície dos meios de cultura, com alça de níquel-cromo ou pipeta Pasteur, com movimentos em estrias em *zig-zag*, para permitir separação de eventuais contaminantes da amostra. O material não deve ser colocado em profundidade no ágar, mas apenas aderido à superfície do meio. O ASD é o meio mais utilizado, por ser relativamente barato e permitir o crescimento de todos os fungos, com raríssimas exceções.

A temperatura de incubação recomendada, para todas as amostras é 30°C, devido a possibilidade de o agente etiológico ser oportunista, e desse modo, crescer melhor a 30°C do que a 37°C, no *primo* isolamento. Além disso, pensando em Brasil, em que, as temperaturas são muito altas na região norte e nordeste, dificilmente alcançam 25°C, a menos que se utiliza estufa BOD ("*body oxygen demand*"). A temperatura de 30°C é verificada, mais facilmente, durante muitas horas do dia.

- Hemoculturas fazem parte da rotina diagnóstica para casos de infecção hospitalar e merecem algumas recomendações à parte, para isolamento de fungos. Os frascos contendo meio bifásico e sangue ou aspirado de medula óssea, devem ser submetidas à agitação manual periódica, para maior homogeneização do oxigênio na fase líquida do frasco. Exames macroscópicos diários da superfície da fase sólida são indicados para verificar aparecimento de colônias de: leveduras dos gêneros *Candida sp*, *Cryptococcus sp* e outros (24 h-7 dias), fungos filamentosos e *Sporothrix schenckii* (2 a 15 d) e fungos dimórficos, como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* (15 a 30d). Qualquer colônia de fungo deve ser repicada em ASD, para posterior identificação.
- O crescimento de fungos, ao contrário de bactérias, não resulta em turvação imediata do meio líquido, de modo que, a análise microscópica de uma gota do meio, abrevia o prazo de resultados positivos. Recomenda-se a pesquisa microscópica do crescimento de fungos corando por Gram, duas gotas do meio líquido, periodicamente, em cada um dos períodos acima citados. Além do exame microscópico da fase líquida, um procedimento que resulta em maior sensibilidade da cultura, é a realização de repiques de 1 ml da fase líquida, para tubos contendo ASD ou BHI, em dias alternados: 2^o, 10^o e 30^o dia.
- Visto que a maioria dos laboratórios brasileiros não trabalha com o meio bifásico, pode-se inocular a amostra, na mesma proporção de 10%, em frascos de hemocultura bacteriológica e fazer a leitura como anteriormente, descrito. Entretanto, sistemas automatizados para hemoculturas, que acusam o crescimento de qualquer microrganismo em até 7 dias, não permitem identificar a presença de fungos de crescimento mais lento. Nesses casos, a incubação por período de até 30 dias, com repiques do caldo em ASD. O procedimento para sangue e aspirado de medula óssea, denominado lise-centrifugação, não é muito difundido no Brasil, pelo custo de importação do sistema. O material biológico é inoculado diretamente no frasco do sistema, que contém

saponina, que lisa as células liberando assim os microrganismos intracelulares. A seguir, deve-se realizar centrifugação que direcionará os elementos fúngicos para o fundo do tubo que já contém o meio de cultura. O sobrenadante é desprezado e, desta forma, a cultura foi realizada, evitando-se subcultivos, que são necessários quando se inocula o material em meios bifásicos ou líquidos. A incubação é feita a 37°C por período de até 30 dias.

Abaixo estão os procedimentos recomendados para exame direto e cultura, visando obter melhor rendimento no isolamento primário de fungos, de acordo com tipo de amostra biológica.

Procedimentos laboratoriais para exame direto e isolamento de fungos, segundo amostra biológica

AMOSTRA BIOLÓGICA	PROCESSAMENTO	EXAME MICROSCÓPICO	MEIO DE CULTURA*
Secreção respiratória	- Fluidificação (recomendada) - Centrifugação - Uso do sedimento	- "a fresco" - KOH a 20% - Giemsa - Tinta nanquim	- ASD - BHI
Líquor	- Centrifugação - Uso de sedimento	- Tinta nanquim - Gram	- ASD
Urina**	- Centrifugação - Uso de sedimento	- "a fresco" - Gram	- ASD
Flúidos corporais (pleural, ascítico, sinovial, pericárdico, gástrico, brônquico)	- Centrifugação - Uso de sedimento	- KOH a 20% - Giemsa	- ASD - BHI
Pus e secreções de abscessos	- Nenhum	- KOH a 20% - Giemsa	- ASD - BHI
"swab" embebido em salina (mucosa oral, nasal, vaginal, anal, olhos, conduto auditivo)	- Centrifugação - Uso de sedimento	- Gram	- ASD
Pele, pelos e escamas	- Nenhum	- KOH a 20%	- ASD
Tecidos e peças	- Fragmentação ou maceração - "Imprint" em lâmina	- KOH a 20% - Giemsa - Tinta naquim	- ASD e BHI
Sangue e medula óssea	- Semeadura em meio de cultura - Esfregaço ou distensão em lâmina	- Giemsa	- BHI bifásico ou líquido - ASD bifásico ou líquido

* Todos os meios sólidos, para isolamento de fungos devem conter cloranfenicol.

** Para contagem de colônias (UFC/ml), semear 0,1 ml de urina em ASD distribuído em placa de Petri, antes de centrifugar.

4. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

O profissional de laboratório deve tentar identificar todas as culturas positivas e emitir o resultado mais acurado possível. Muitas vezes, o exame microscópico da amostra é suficiente para medidas de controle da infecção, outras vezes somente o isolamento e identificação do fungo pode orientar a conduta clínica. A identificação dos fungos, de modo ideal, deve contemplar o gênero e a espécie; porém, muitas vezes, isso não é possível, pelo grau de dificuldade e complexidade do exame. Nestes casos a identificação do grupo de fungos, suficiente para o diagnóstico de micose, por ex., zigomicetos, feo-hifomicetos, dermatófitos, leveduras, etc.

O isolamento de um fungo em meio de cultura não significa, necessariamente, que ele é o agente etiológico da infecção. A presença de fungos na microbiota (flora) de pacientes, por ex. *Candida sp* e no meio ambiente, por ex. *Aspergillus sp*, pode resultar em cultura positiva. Isto explica o grande número de culturas positivas para fungos, a partir de uma amostra biológica. A relação entre o fungo isolado em meio de cultura e sinais e sintomas, é critério clínico-epidemiológico. No entanto, deve-se sempre valorizar o isolamento de um fungo procedente de:

- Qualquer amostra biológica que mostrou resultado positivo ao exame microscópico
- Micose cutânea
- Fluídos corporais normalmente estéreis
- Tecidos obtidos por biópsias ou peças operatórias
- Urina, obtida por sondagem ou cistoscopia, independente da contagem de colônias
- Raspado de córnea
- Paciente imunodeprimido (transplantado ou com Aids)
- Paciente em uso de antibióticos por longo tempo, internado em unidade de terapia intensiva ou submetido a ventilação, cateterismo ou outras manipulação
- Paciente de hemodiálise ou debilitado que apresente algum sintoma ou sinal de doença infecciosa independente do tipo de amostra clínica

Além desses casos, têm importância as culturas de fungos:

- Dimórficos
- Isolados mais de uma vez, do mesmo tipo de amostra biológica, coletada em diferentes dias e procedentes do mesmo paciente
- Isolados de ponta de cateter (alimentação parenteral, infusões venosas, etc.)

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS (Morfológica e Bioquímica)

A morfologia das leveduras, ao contrário do que ocorre com os bolores, não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para sua identificação. Em determinadas situações, no entanto, a identificação rápida, simples e presuntiva pode ser feita, contribuindo para o diagnóstico do quadro infeccioso. Desse modo, se a levedura apresenta hifas hialinas e ramificadas, é sugestivo do gênero *Candida sps* e se, além disso, desenvolver clamidósporos -células de reserva- ou tubos germinativos, em determinadas condições "in vitro", é identificada como *Candida albicans*. Outros gêneros, tais como, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* e *Trichosporon*, também podem, na grande maioria das vezes, ser identificados apenas, por sua morfologia característica. O restante dos gêneros e espécies, porém, necessita de provas bioquímicas para sua identificação. No entanto, do ponto de vista clínico, nem sempre é importante a identificação acurada da levedura. Por outro lado, a identificação, pode ter interesse epidemiológico. Para leveduras relacionadas a episódios de infecção hospitalar, por ex., há grande preocupação no estudo das espécies dos agentes, como marcador epidemiológico temporal e espacial de infecções, como no caso de espécies de *Candida* que têm menor sensibilidade a antifúngicos azólicos.

Colônias de levedura obtidas de amostra biológica, só devem ser identificadas, quando estiverem puras, ou seja, sem contaminação bacteriana ou em mistura de espécies. Para tanto, deve ser realizado o plaqueamento de cada colônia morfologicamente distinta e confirmada sua pureza, por microscopia. De cada colônia deve ser feito um repique em ASD para sua identificação.

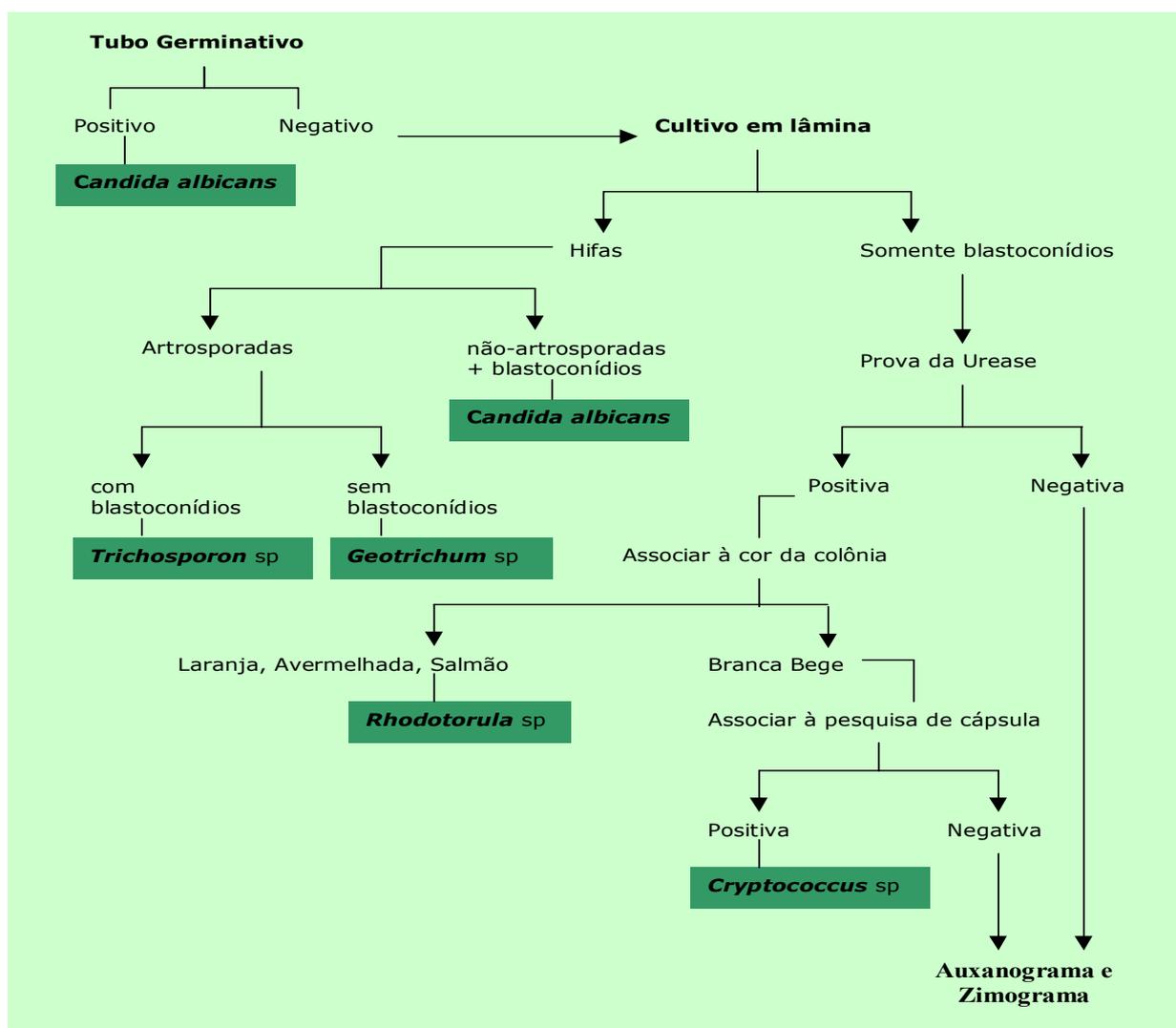
As provas fisiológicas mais comuns e mais simples para identificação de *Candida albicans* e *Candida sp* são: tubo germinativo e filamentação em cultivo em lâmina. No cultivo em lâmina, avalia-se a capacidade de produção de hifas hialinas ramificadas que podem se fragmentar em esporos, denominados artroconídios. Estas hifas ocorrem nos gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon*. Caso a levedura forme hifas hialinas ramificadas sem fragmentação, provavelmente pertence ao gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos característicos, é *Candida albicans*.

A pesquisa de cápsula, característica marcante do gênero *Cryptococcus* é feita com uma gota de tinta nanquim e uma alçada da cultura. A cápsula, constituída de material polissacarídico, aparece como um halo claro ao redor dos blastoconídios de *Cryptococcus* e contrastam com o fundo negro da lâmina.

A prova de urease, disponível em todo laboratório de microbiologia é muito utilizada em micologia. A reação positiva para urease, junto com análise morfológica permite identificação presuntiva de *Cryptococcus sp*. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são também urease positiva mas, como em regra, apresentam colônias com pigmento avermelhado ou salmão, são facilmente distinguidas de *Cryptococcus sp*. Outros gêneros incluindo *Candida sp*, produzem urease, mas tem outras características para sua identificação.

O esquema abaixo propõe um fluxo para identificação das principais leveduras de interesse médico. Se as provas não conduzirem à identificação presuntiva do gênero, provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (**auxanograma**) e fermentação de carboidratos (**zimograma**) devem ser realizadas e interpretadas segundo tabelas existentes na bibliografia recomendada ao final deste capítulo. Um exemplo simplificado é a **Tabela 1**.

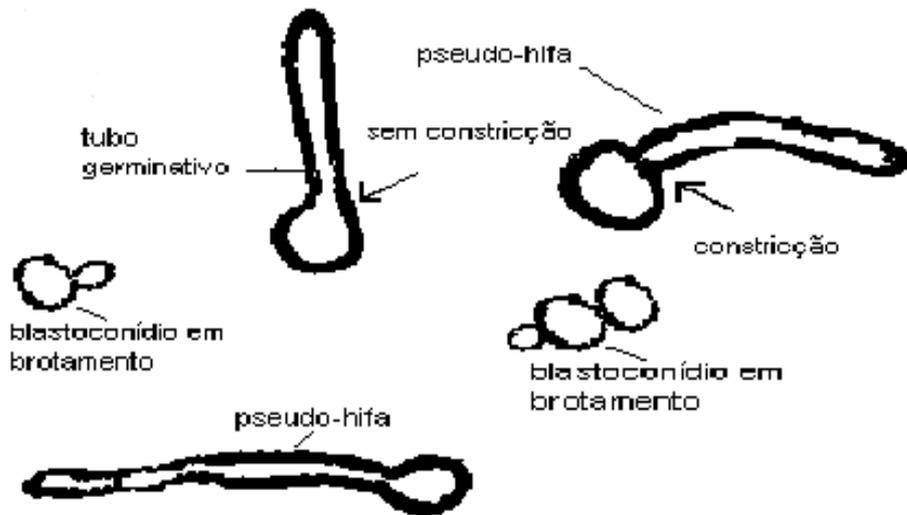
Esquema simplificado para identificação de alguns gêneros de leveduras



PROVA DO TUBO GERMINATIVO

A partir de uma alçada da colônia isolada, fazer uma suspensão em tubo de ensaio contendo 0,5 ml de soro humano (pode-se usar também soro estéril de bovino, cavalo ou coelho). Incubar a 37°C durante período **máximo de 3 horas**. Este prazo é importante porque, após esse período, outras espécies de *Candida* e de outros gêneros, formam também tubo germinativo. Depositar então, uma gota da suspensão sobre lâmina, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio óptico. A presença de tubo germinativo, na forma de pequeno filamento que brota do blastoconídio, sem formar constrictão com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva de ***Candida albicans***.

Prova do tubo germinativo com blastoconídios, tubo germinativo e pseudo-hifas de *Candida albicans*



CULTIVO EM LÂMINA PARA PROVA DE FILAMENTAÇÃO E CLAMIDÓSPORO

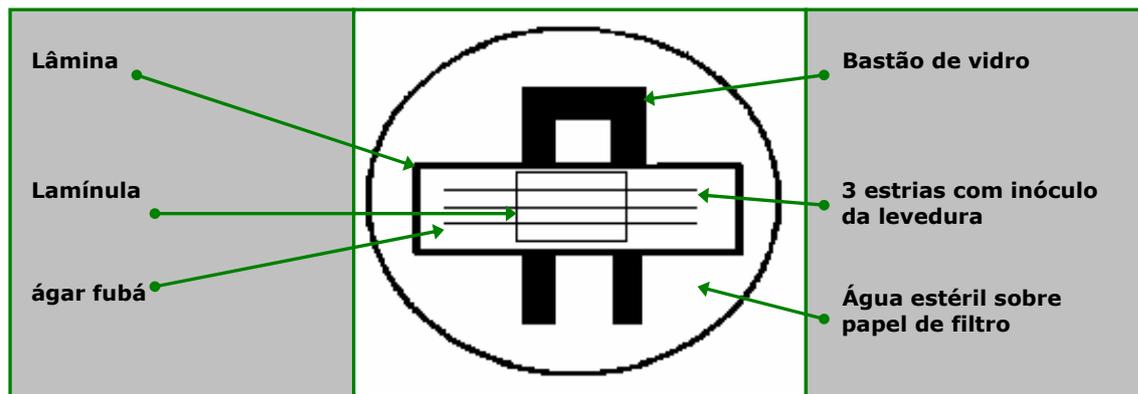
Depositar 3 ml de ágar-fubá fundido, sobre uma lâmina contida sobre um suporte dentro de uma placa de Petri. O suporte para a lâmina pode ser um bastão de vidro, outra lâmina ou apenas dois palitos de madeira. Após solidificação do meio, semear a levedura, com auxílio de uma agulha em "L", fazendo 2 estrias paralelas. Recobrir as estrias com lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida, acrescentando 2 ml de água destilada estéril na placa, ou embebendo um algodão estéril, para evitar dessecação do meio, durante o período de incubação da prova. Tampar a placa e após 24h, 48h e 72h, examinar a preparação em microscópio ótico. A presença de hifas hialinas, septadas e ramificadas, característica o gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos indica *Candida albicans*. Formação exclusiva de artrósporos permite identificação de *Geotrichum*, mas quando são formados também blastoconídios trata-se de *Trichosporon*. O meio de ágar fubá ou farinha de milho pode ser adquirido no comércio (CornMeal agar) mas sua formulação é simples, ressaltando-se que de todas as maneiras, deve-se acrescentar a substância tensoativa **tween 80**, para que a prova dê resultados confiáveis. O meio tem a seguinte composição e preparo:

Meio ágar Fubá

Fubá	20 g
Ágar	10 g
Tween 80	5 ml

Adicionar o fubá em 250 ml de água e ferver até borbulhar. Filtrar o fubá em gaze dobrada em quatro. Dissolver o ágar em 250 ml de água. Restaurar o volume da infusão de fubá para 250 ml, com água quente, juntar as suspensões, ajustar o pH para 6,6 – 6,8 e adicionar o Tween 80. Distribuir volumes de 5 ml em tubos e esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Cultivo em lâmina para prova de filamentação e clamidósporo



PROVA DA UREASE

- Semear uma alçada da levedura na superfície do meio de urease (ágar uréia de Christensen).
- Incubar à temperatura de 37°C.

A mudança da cor do meio para rosa bispo em 24 h, indica reação positiva.

PROVA DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO OU AUXANOGRAMA

Nessa prova são usados 2 meios, que podem ser adquiridos no comércio, na forma desidratada (*Yeast Nitrogen Base* e *Yeast Carbon Base*) ou formulados. A levedura é semeada "pour plate", homogeneizando-se 2 ml de uma suspensão das colônias, a cada meio fundido ou semeada na superfície de cada um dos meios, previamente, distribuídos em 2 placas de Petri. São então adicionadas pequenas alíquotas de diferentes carboidratos que servem de fonte de carbono, sobre a superfície do meio isento de carbono. Várias substâncias, incluindo álcoois, proteínas e aminoácidos servem de fontes de nitrogênio e são colocadas sobre a superfície do meio isento de nitrogênio. Após incubação à temperatura ambiente ou 25°C, por período de uma semana, a levedura irá assimilar e crescer em volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico de sua espécie. A leitura é feita pelo halo de turvação resultante do crescimento e indica prova de assimilação positiva para a respectiva fonte. Os resultados são comparados a tabelas existentes na bibliografia recomendada e um exemplo simplificado consta na tabela abaixo.

Identificação das principais leveduras de interesse médico

Levedura	Tg	Cultivo em lâmina		Ur	Assimilação									Fermentação					
		Hifa	Ar		Sa	Ma	La	Ce	Tr	Ra	X	I	NO ₃	Gl	Sa	Ma	La	Ra	Tr
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	V
<i>C. tropicalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	-	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
<i>C. krusei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	V
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	+	+	+	-	V	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon</i>	-	+	+	V	+	+	+	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula sp</i>	-	-	-	+	+	V	-	V	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	V

Tg = tubo germinativo, Ar = artrósporo, Ur= urease, Sa = sacarose, Ma=maltose,La = lactose, Ce = celubiose, Tr = trealose, Ra = rafinose, X = xilose, I = inositol,NO₃ = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

FERMENTAÇÃO DE ACÚCARES OU ZIMOGRAMA

A capacidade de fermentar carboidratos, ao lado do auxanograma, irá completar o perfil bioquímico da levedura permitindo, em regra, a identificação acurada de gênero e espécie (**QUADRO 3**). As características morfológicas são fundamentais para concluir a identificação, desde que **diversas espécies têm perfis bioquímicos idênticos, mas morfologias distintas**. Para o zimograma, diversas fontes de carboidratos são colocadas em tubos respectivos, contendo meio básico líquido. A levedura é semeada em cada tubo e após período de até 15 dias a 25°C, a fermentação é revelada por formação de bolhas de gás, observadas dentro de tubos de Durhan, colocados previamente, durante a preparação do meio básico.

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação de fungos filamentosos tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo. Porém, o mais adequado é a análise a partir da "colônia gigante", ou seja, uma cultura feita no ponto central de uma camada de ágar distribuído em placa de Petri. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (≤ 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (≥ 15 dias) é fundamental para identificação presuntiva do fungo.

A observação das estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação de fungos filamentosos. Em alguns grupos porém, como os fungos demácios, pode ser necessário também uso de provas bioquímicas. A morfologia microscópica é melhor visualizada com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, por ex. esporângios que são órgãos de reprodução de zigomicetos.

Os fungos filamentosos, patogênicos ou contaminantes ambientais, potencialmente oportunistas, formam um grupo muito extenso, impossível de ser tratado neste Manual. Para identificação das diversas espécies ou grupos existe bibliografia especializada de textos, manuais e atlas, indicados no final deste capítulo. Dentro do objetivo deste Manual serão ilustrados aspectos microscópicos de alguns fungos de interesse em medicina (vide Figuras adiante).

TÉCNICA DE MICROCULTIVO PARA FUNGOS FILAMENTOSOS

Colocar sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril, um cubo de ágar: ASD ou ágar batata. A lâmina deve estar sobre um suporte, que pode ser formado por outra lâmina, ou um pequeno bastão de vidro recurvado, ou ainda, dois palitos de fósforo. Semear o fungo, a partir de repique recente, nos 4 lados do cubo de ágar. Recobrir com uma lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida, adicionando 1 a 2 ml de água destilada estéril no fundo da placa ou embeber um pequeno chumaço de algodão estéril, para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. Tampar a placa e deixar à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que se observe desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação.

Após esse período, inativar a esporulação, adicionando 1 ml de formol ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24h-48h. O vapor de formol, além de inativar o fungo, irá auxiliar na fixação das estruturas microscópicas. Retirar a lamínula com auxílio de uma pinça, cuidadosamente, uma vez que nela deverão estar aderidas as hifas e esporos do fungo. Pingar uma gota de corante azul de lactofenol-algodão ("Cotton Blue") e montar sobre uma lâmina. Desprezar o cubo de ágar e, em seu lugar, pingar outra gota de corante azul e recobrir com lamínula, para visualizar esporos e hifas também aderidos à lâmina. Observar em microscópio ótico com objetiva de 40 X, o tipo e cor da hifa, forma disposição e formação de esporos.

O corante azul de lactofenol-azul algodão, utilizado na microscopia de culturas de fungos filamentosos, é formulado e preparado da seguinte forma:

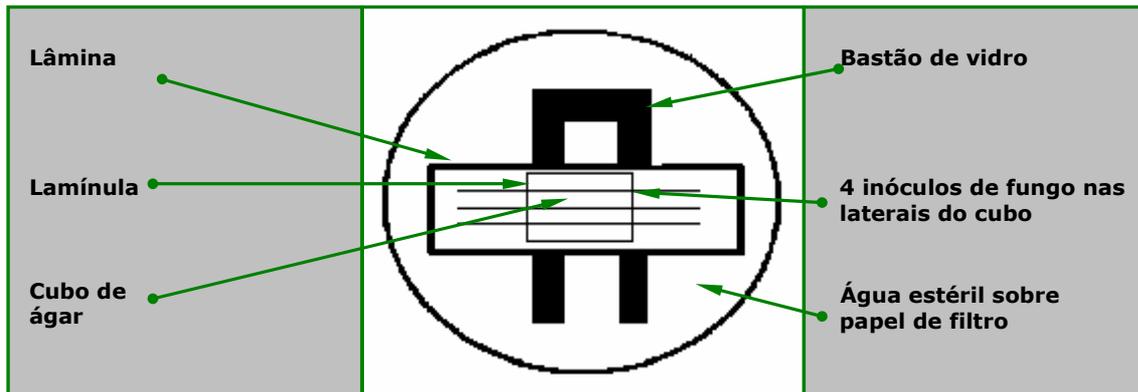
Azul de lactofenol-algodão

Ácido láctico	20g
Cristais de fenol	20g
Glicerina	20g
Azul algodão	0,05g
Água destilada	20g

- Fundir os cristais de fenol em banho-maria e juntar
- Esperar 24 h e filtrar

O azul algodão pode ser substituído pelo azul de metileno.

Técnica de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos



Fungos anemófilos de hifas hialinas e septadas (hialohifomicetos)

Aspergillus



Penicillium

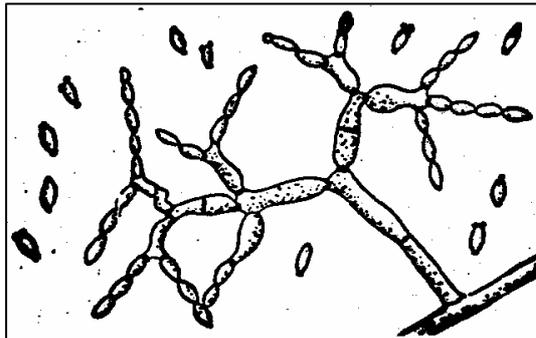


Fusarium



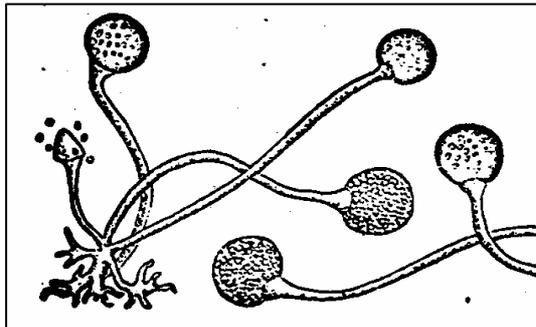
Acremonium





FUNGO ANEMÓFILO DE HIFAS SEPTADAS E MARRONS (DEMÁCIO)

Cladosporium



FUNGO ANEMÓFILO DE HIFAS HIALINAS E CENOCÍTICAS (ZIGOMICETO)

Rhizopus

Dermatófitos agentes de micoses cutâneas



Trichophyton rubrum

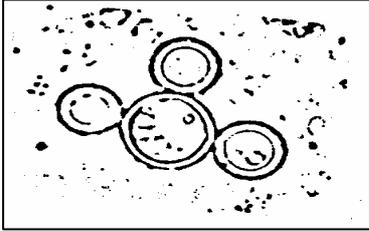


Microsporum canis

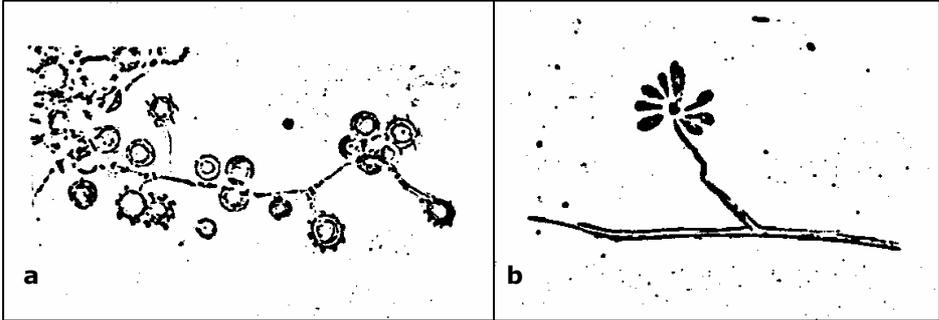
IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DIMÓRFICOS

Dimórficos são fungos filamentosos que podem, sob determinadas condições, assumir forma de levedura, diminuindo a capacidade de filamentação e dividindo-se por brotamento, conferindo às colônias aspecto cremoso. Esta fase leveduriforme ocorre sob temperatura acima de 30°C, de preferência a 37°C. São fungos de crescimento lento (≥ 15 dias) no *primo*-isolamento (*Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* ou moderado (8 a 14 dias), como *Sporothrix schenckii*. A identificação é feita pela comprovação do dimorfismo e pelo aspecto microscópico característico de cada fase.

***Paracoccidioides brasiliensis* in vivo e in vitro (37°C).**



***Histoplasma capsulatum* (a) e *Sporothrix schenckii* (b) in vitro (25°C).**



5. DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS MICOSES

As localizações topográficas mais frequentes, relacionadas aos agentes fúngicos, serão apresentadas de forma resumida.

Agentes etiológicos e localizações topográficas

	Derma- tófitos	H. capsulatum	P. brasiliensis	S. schenckii	Aspergillus sp	Candida sp	C. neoforman	Zigo- micetos
Trato respiratório		X	X		X	X	X	X
Sangue		X	X		X	X	X	X
Osso			X	X	X	X	X	
Medula óssea		X						
Pele e Unha	X					X		
Pelo	X							
Cérebro		X	X		X	X	X	X
Líquor		X				X	X	
Ouvidos					X			
Olhos					X	X		
Fígado e Baço		X	X					
Naso-faringe			X		X	X		X
Mucosas		X	X			X		
Tecido sub- cutâneo e gânglios		X	X	X	X			X
Trato urinário			X			X	X	
Trato gastrointestinal			X			X		

DERMATOFIToses (TINEAS)

São infecções fúngicas limitadas às camadas superficiais queratinizadas da pele, pelos e unhas, popularmente, conhecida como "epíngue" ou "frieira", dependendo da localização das lesões que são extremamente pruriginosas. Em imunodeprimidos podem acometer tecidos subcutâneos.

Agentes etiológicos: *Microsporium spp*, *Trichophyton spp* e *Epidermophyton floccosum*

Ocorrência: universal, acometendo indivíduos de qualquer idade, sexo ou raça.

Fontes de infecção: contágio direto com animais, solo ou indivíduo infectado.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: escamas de pele, unha e cabelos
- Exame da amostra com KOH a 20%, revela hifas regulares, hialinas, septadas, refringentes, frequentemente artrosporadas.
- Cultura: material deve ser semeado em ASD, com auxílio de uma alça em "L", de forma a ficar em perfeito contato com o meio de cultura. As colônias de dermatófitos geralmente, crescem a partir do 10º dia de incubação à temperatura ambiente e os fungos são identificados pela sua morfologia macroscópica e microscópica. No Brasil, os dermatófitos mais frequentes são *T. rubrum* e *M. canis*.

PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Doença granulomatosa, crônica que pode acometer pele, mucosas, linfonodos, sistema respiratório, trato gastrointestinal, adrenais, fígado, baço e SNC. Apresenta grande variabilidade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até formas disseminadas de mau prognóstico, na dependência da resposta imune do hospedeiro. Existe também a paracoccidioidomicose-infecção, em que o indivíduo não apresenta sinais e sintomas mas, demonstra por testes intradérmicos positivos, que entrou anteriormente, em contato com o fungo. Apresenta muitas semelhanças com a tuberculose.

Agente etiológico: *Paracoccidioides brasiliensis*

Ocorrência: países da América Latina, principalmente Brasil.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: raspado de lesão e mucosa, secreção do trato respiratório, aspirado de linfonodos, tecido obtido por biópsia.
- Exame direto com KOH a 20% revela a presença da forma leveduriforme constituída de células grandes (10µm a 60 µm), globosas, com parede celular dupla e refringente e com múltiplos brotamentos, à semelhança de "roda de leme", orelhas de "Mickey Mouse" ou argolas entrelaçadas.
- Cultura: fungo dimórfico de crescimento lento (≥ 15 dias). Culturas desenvolvidas a $\leq 30^{\circ}\text{C}$ são filamentosas, de cor branca, cotonosa, com sulcos centrais, composta de hifas hialinas finas, septadas e fragmentadas em esporos multiformes. As colônias incubadas entre 30°C a 35°C são de cor creme, pregueadas e enrugadas, cuja microscopia revela as formas características leveduriformes que permitem a identificação do agente.

HISTOPLASMOSE

Doença que acomete primariamente o sistema retículoendotelial. A infecção pode ser localizada ou generalizada. A histoplasmose primária afeta o sistema respiratório e a histoplasmose progressiva atinge fígado, baço, linfonodos, mucosas, medula óssea, etc. Em indivíduos hígidos, a infecção tem bom prognóstico porém atualmente, é importante infecção oportunista associada à Aids, nos quais ocorre a forma grave e disseminada.

Agente etiológico: *Histoplasma capsulatum*

Ocorrência: distribuição universal, principalmente em países de clima temperado.

Fontes de infecção: inalação de esporos presentes em aerossóis formados por solos contaminados com excretas de galinhas e morcêgos.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: secreção do trato respiratório, sangue, punção de medula óssea, tecido obtido por biópsia de mucosas e outros.
- Exame microscópico direto, sem coloração, requer muita habilidade do técnico. Recomenda-se coloração por Giemsa, para melhor visualização do agente em de cortes histológicos, onde se evidencia sob imersão, pequenas leveduras (2-5 µm), intracelulares, dentro de células mononucleares.
- Cultura: fungo dimórfico de crescimento lento (15 a 30 dias) sendo que no *primo*-isolamento é mais fácil obter a forma filamentosa de cor branca, aspecto cotonoso e sulcado, à temperatura $\leq 30^{\circ}\text{C}$. A confirmação do dimorfismo é feita através de repique em meio rico (BHI) e incubação entre 30°C e 35°C . A transformação da forma filamentosa ou miceliana à fase leveduriforme, é vista com a formação de pequenas (2-5 µm) leveduras em brotamento. A identificação porém, é feita pela micromorfologia da forma **filamentosa**, com a observação de esporos grande-macroconídios- arredondados e com inúmeras espículas ou granulações na parede celular, chamados hipnósporos ou esporos tuberculados.

ESPOROTRICOSE

Infecção crônica cuja forma clínica mais freqüente em nosso meio é a forma linfangítica nodular ascendente. Atinge em geral, uma das extremidades sob forma de lesão ulcerada no ponto de inoculação e acomete a drenagem linfática regional com formação de gomas no trajeto. As formas disseminadas são raras, em paciente imunocompetentes, mas frequentes em pacientes com Aids.

Agente etiológico: *Sporothrix schenckii*

Ocorrência: doença de distribuição universal que acomete principalmente, trabalhadores rurais e floristas.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: aspirado das lesões gomosas ou tecido subcutâneo.
- Exame microscópico da amostra apresenta baixa sensibilidade mas, exame de cortes de tecido corados, pode revelar leveduras em forma de "charuto" ou apenas formas ovaladas com divisão em brotamento (blastoconídios).
- Cultura: fungo dimórfico que se desenvolve bem em ASD, entre 7 a 12 dias e cuja forma filamentosa ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) apresenta hifas hialinas finas e septadas com esporos disposto em arranjo semelhante à flor "margarida". A forma leveduriforme ($> 30^{\circ}\text{C}$), não é característica do gênero e requer meios ricos acrescidos de sangue, cisteína e submetidos a tensão de CO_2 . O interesse na obtenção da fase leveduriforme é para a diferenciar o agente da esporotricose, do gênero *Sporothricum*, fungo filamentoso não-dimórfico e anemófilo de meio ambiente. A forma **filamentosa** apresenta na microscopia a forma adequada para identificação do agente.

ASPERGILOSE

A aspergilose pode se apresentar em indivíduos imunocompetentes, como lesões localizadas em unhas, pés, canal auditivo, olhos e forma bronco-pulmonar alérgica. Em pacientes imunocomprometidos, tende à forma disseminada ou cerebral, de alta letalidade, geralmente, associada a neutropenia ou à doenças debilitantes.

Agente etiológico: *Aspergillus fumigatus* (o mais comumente isolado)

Ocorrência: tem distribuição universal. É crescente o número de relatos desta doença como infecção secundária em pacientes em tratamento prolongado com antibiótico e corticosteróides, doenças debilitantes como carcinoma, tuberculose, pacientes neutropênicos, e em lesões de tecidos subcutâneos, da pele ou da córnea.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: secreção do trato respiratório, material de biópsia e lavado brônquico.
- O exame microscópico revela hifas septadas e hialinas, com 4 a 6 μm de diâmetro e que se ramificam em ângulo de até 45° .
- Cultura: colônias de *Aspergillus fumigatus*, a espécie mais associada à doença em humanos, podem ser facilmente, isoladas em ASD, em até 7 dias (crescimento rápido) com desenvolvimento, na superfície do meio, de filamentos brancos-hifas - que se tornam verde a verde-acinzentado, com a formação de esporos.

CRÍPTOCOCOSE

A criptococose é uma infecção subaguda ou crônica que envolve primariamente, os pulmões, com tropismo pelo sistema nervoso central -meninges-, podendo atingir pele e outros tecidos.

Agente etiológico: *Cryptococcus neoformans*

Ocorrência: no homem, a distribuição da doença é universal.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: líquido, secreção do trato respiratório ou de lesão de pele, aspirado de formação tumoral subcutânea e tecidos obtidos por biópsia. O exame laboratorial deverá incluir urina, de preferência após massagem prostática, para monitorar a presença do agente na próstata que constitui seu órgão de reserva.
- Exame obrigatoriamente, com tinta nanquim para observação de células capsuladas, com diâmetro variável, entre 5 μm a 20 μm , que sugerem *Cryptococcus sp.*
- Cultura: secreção do trato respiratório, líquido e tecidos podem ser cultivados em ASD ou qualquer outro meio, desde que não contenham cicloheximida que inibe *Cryptococcus*. O agente cresce rápido (≤ 7 dias) entre 25°C e 37°C , sob forma de colônias mucóides de coloração creme à parda. A identificação de gênero e espécie é feita através de provas bioquímicas, como: teste da urease e auxanograma.

CANDIDIÁSE

Candidíase é uma doença com manifestações clínicas variadas. As infecções aguda e crônica mostram lesões na boca, faringe, pele, unhas, sistema broncopulmonar, intestinal e perianal. Ocasionalmente, endocardite, meningite, fungemia ou infecções em outras localizações podem ser observadas.

Agentes etiológicos: *Candida albicans* e outras espécies, que estão frequentemente, envolvidas em casos de micoses oportunistas em pacientes debilitados. São os principais agentes etiológicos de Infecções hospitalares. As espécies de *Candida* podem ser isoladas de vários locais do corpo humano, como microbiota normal de cavidade oral, mucosa vagina, região perianal e trato gastrointestinal.

Ocorrência: - universal, incluindo as formas graves que ocorrem sob fatores predisponentes para desenvolvimento da doença, tais como: desnutrição, obesidade, diabetes, gravidez, antibioticoterapia, quimioterapia e uso de corticosteróides, manipulação endovenosa inadequada, neoplasias e outras doenças debilitantes.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: (dependerá da sintomatologia clínica) fragmentos de pele e unhas; raspados da mucosa oral, vaginal ou anal; secreção do trato respiratório, sangue, liquor, urina e fezes.
- Exame de fragmentos de pele e unhas devem ser feitos com solução de KOH 20%. Secreção do trato respiratório ou material de mucosa podem ser examinados pela coloração de Gram. A levedura aparece como células arredondadas, com brotamentos com ou sem hifas. Pequenas células podem ter diâmetro de 2-6µm, mas formas maiores são também observadas.
- Cultura: o crescimento é rápido (24-72h) entre 25°C e 37°C. O aparecimento ocorre em torno de 3 a 4 dias, com formação de colônias com coloração branca à bege. A habilidade de formar tubo germinativo e/ou clamidósporos na prova de cultivo em lâmina, permite a identificação de *C. albicans*. Para a identificação das outras espécies do gênero *Candida* deve-se, além do cultivo em lâmina, proceder-se à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma) e fermentação de fontes de carbono (zimograma) .

ZIGOMICOSE

Infecção geralmente, subaguda de evolução rápida que acomete indivíduos debilitados, transplantados, diabéticos descompensados ou ainda com Aids. Pode acometer seios paranasais, tecido subcutâneo, pulmão e vasos sanguíneos, causando embolia no SNC e trombose. A micose, em indivíduos imunodeficientes é, em geral, fatal se o diagnóstico não for rápido e o tratamento específico não for prontamente, estabelecido.

Agentes etiológicos: fungos da classe dos Zigomicetos, compreendendo os gêneros *Mucor*, *Rhizopus* e *Absidia*, entre outros.

Ocorrência: distribuição universal.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: secreção de sinus nasal ou tecidos obtidos por biópsia de seios paranasais ou lesões subcutâneas.
- Exame com KOH a 20%, revela hifas hialinas e largas (6-50µm), cuja característica principal é a ausência de septos, que caracterizam as hifas cenocíticas, desse grupo de fungos.
- Cultura: fungos de crescimento rápido (< 72 h) a 25°C em ASD, com hifas aéreas abundantes. A identificação é feita pela microscopia da colônia que evidencia hifas cenocíticas e esporos contidos dentro de estruturas fechadas denominadas esporângios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoog, G.S, Guarro, J., Figueras, M.J. and Gene, J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2ª Ed., CBS, Utrecht, Holanda, 2000.
2. Kane, J., Summerbell, R., Sigler, L., Krajden, S. and Land, G. **Laboratory handbook of Dermatophytes: a Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi from kin, Hair and Nails**, Star Publishing Co., Belmont, Ca, 1997.
3. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (coord.) **The Yeasts – A taxonomic study**, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Holanda, 1998.
4. Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J. E. **Medical Mycology** , 1992.
5. Lacaz C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9ª ed., Sarvier, São Paulo, 2002.
6. Lacaz, C. da S., Porto, E., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T. **Guia Para Identificação de Fungos Actinomicetos e Algas de interesse médico**, 8º ed., ed. Sarvier, São Paulo, 1998.
7. Larone, D.H. **Medically Important Fungi: A guide to Identification**, 3º ed., Washington, DC., 2000.
8. Maza, Pezzlo and Baron **Atlas de Diagnóstico em Microbiologia**, ed. Artmed, Porto Alegre, 1999.
9. Mendes-Giannini, M.J. and Melhem, M.S.C. *Fungos In: Ferreira, A.W. and Ávila, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, 2ªed., Guanabara-Koogan , Rio de Janeiro, 2001.
10. Midley, G., Clayton, Y.M. and Hay, R.J. **Diagnóstico em cores. Micologia Médica**, Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1998.
11. Minami, P.S. **Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses**, Ed. Manole Ltda, São Paulo, 2003.
12. Rippon, J.W. **Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1982.
13. Sidrim, J.J.C. and Moreira, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
14. Von Nowakonsky, A., Silva, C.R.N. and Melhem, M.S.C. **Fungos e Aids: diagnóstico de infecções oportunistas**, ed. Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, Série Telelab nº22, 2001.
15. Zaitz, C., Campbell, I., Marques, S.A., Ruiz, L.R.B. and Souza, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**, ed. Medsi, Rio de Janeiro, 1998.