



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Saúde
Dr. Ricardo Jorge

Programa Nacional de Controlo de Infecção



**ORIENTAÇÕES
PARA A ELABORAÇÃO
DE UM MANUAL DE BOAS PRÁTICAS
EM BACTERIOLOGIA**

2004

AUTORES

- Ana Bruschy Fonseca (Centro Hospitalar de Cascais)
- Clotilde Sebastião (Hospital Distrital de Abrantes)
- Filomena José Cardoso Martins (Hospital de S. Francisco Xavier)
- Maria da Graça V. Carvalho Ribeiro (Hospitais da Universidade de Coimbra)
- Ismália Calheiros (Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia)
- Luís Marques Lito (Hospital de Santa Maria)
- Margarida Bivar Abecassis (Hospital de Pulido Valente)
- Margarida Isabel Feijó Pinto (Hospital de Santa Marta)
- Maria Odete Chantre Spencer (Hospital de São José)
- Maria Paula S. Falcão M. Pinheiro (Hospital Dr. José Maria Grande - Portalegre)
- Maria Teresa M. Pina M. Costa (Hospital Curry Cabral)
- Rosa Maria Barros (Hospital de Dona Estefânia)
- Rosa Fula Bento (Hospital José Joaquim Fernandes - Beja)

Colaborações

- Elaine Pina (Programa Nacional de Controlo da Infecção - PNCI e Hospital de S. António dos Capuchos)
- Helena Ramos (Hospital Geral de Santo António – Porto)

Redacção Final e Uniformização

- Ana Bruschy Fonseca
- Luís Marques Lito
- Maria Teresa M. Pina M. Costa

Formatação

- Ana Bruschy Fonseca

Revisão

- Maria José Salgado (Hospital de Santa Maria)
- Elaine Pina, Coordenadora do PNCI
- Maria Goreti Silva, Enfermeira do PNCI

Publicação

- Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI)
- Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA)

INTRODUÇÃO

O presente trabalho resulta do empenho de um grupo de Microbiologistas Clínicos que, durante alguns anos, se reuniu periodicamente sob a égide do Programa Nacional de Controlo de Infecção. Para o seu desenvolvimento, os autores recorreram à bibliografia da especialidade, mas introduziram também uma forte componente da experiência adquirida pelo seu trabalho diário.

As “ORIENTAÇÕES PARA A ELABORAÇÃO DE UM MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM BACTERIOLOGIA”, tal como o nome indica, tem como objectivo permitir aos responsáveis pelos Laboratórios de Microbiologia a elaboração do seu proprio “Manual de Boas Práticas”. Assim, neste trabalho, são colocados à disposição meios que os poderão ajudar a melhor desenvolver esta desejável tarefa.

Neste documento são exclusivamente tratados temas relacionados com a Bacteriologia, não estando portanto incluídas áreas igualmente importantes como a Micobacteriologia, a Micologia, a Virologia ou a Parasitologia.

Agradecimentos:

O grupo de trabalho que elaborou este Manual de Boas Práticas agradece a todos quantos contribuíram de forma directa ou indirecta para a sua elaboração e divulgação. Agradecemos de modo especial, à Exm.^a Sr.^a Dr.^a Elaine Pina, Coordenadora do PNCI, à Exm.^a Sr.^a Dr.^a Maria José Salgado, Microbiologista do Hospital de Santa Maria pela disponibilidade, apoio, sugestões e ensinamentos e à Exm.^a Sr.^a Enf.^a Maria Goreti Silva do PNCI pelo trabalho de revisão do Manual.

ÍNDICE

1. GENERALIDADES	
1.1. Técnicas Laboratoriais usadas no estudo das bactérias	5
1.2. Uso do Microscópio	5
1.3. Desenvolvimento das bactérias em meios de Cultura	8
1.4. Identificação das bactérias	12
1.5. Conservação e Transporte de produtos biológicos e estirpes bacterianas	19
1.6. Esterilização e Desinfecção	21
1.7. Tratamento de Resíduos Sólidos	25
2. NORMAS de COLHEITA e TRANSPORTE de PRODUTOS	26
3. PROCESSAMENTO dos PRODUTOS para EXAME BACTERIOLÓGICO	
3.1. Urina	40
3.2. Hemocultura	44
3.3. Líquido Céfalo-raquidiano	50
3.4. Líquidos de Serosas	52
3.5. Aparelho Respiratório Superior	54
3.6. Aparelho Respiratório Inferior	59
3.7. Exsudados Oculares	65
3.8. Exsudados Purulentos	72
3.8.1. Biópsias cirúrgicas e Cateteres Vasculares	75
3.9. Fezes	78
3.10. Aparelho Genital	82
3.11. Amostras para Pesquisa de Anaeróbios	89
4. IDENTIFICAÇÃO de MICRORGANISMOS	
4.1. Identificação de COCOS Gram Positivo	100
4.2. Identificação de BACILOS Gram Positivo	105
4.3. Identificação de COCOBACILOS Gram Negativo	111
4.4. Identificação de <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	118
4.5. Identificação de BACILOS Gram Negativo não-fermentadores	122
4.6. Identificação de <i>BRUCELLA</i> spp.	127
4.7. Identificação de MICRORGANISMOS EXIGENTES	129
4.8. Identificação das <i>VIBRIONACEAE</i> spp.	135
3. TESTE de SUSCEPTIBILIDADE aos ANTIMICROBIANOS	138
4. QUALIDADE em MICROBIOLOGIA	159
5. LABORATÓRIO de MICROBIOLOGIA e INFECÇÃO HOSPITALAR	178

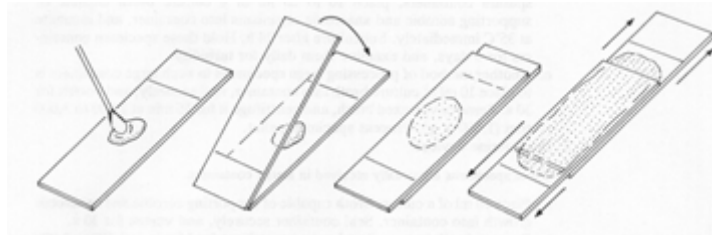
GENERALIDADES

1. TÉCNICAS LABORATORIAIS USADAS NO ESTUDO DE BACTÉRIAS

1.1 - USO DO MICROSCÓPIO

1.1.1 TÉCNICA DO ESFREGAÇO

- **Amostras biológicas líquidas e culturas de caldo** – colocar o produto numa lâmina e estender em camada fina. Secar a preparação e fixar (calor ou metanol).
- **Amostras biológicas sólidas e culturas de meios sólidos** – colocar sobre a lâmina uma gota de água destilada e juntar uma pequena porção do produto, emulsioná-la na gota, estendendo de seguida. Secar e fixar como anteriormente.
- **Amostras espessas ou purulentas** (ex.: expectoração) – utilizar a **técnica de estiramento** – colocar uma porção de produto numa lâmina e pressionando com outra lâmina, fazer deslizar as duas lâminas ao longo uma da outra, várias vezes



Preparação do esfregaço por técnica de estiramento

1.1.2. EXAME A FRESCO

Colocar o produto numa lâmina, cobrir com uma lamela e observar ao microscópio com objectiva de 40x. Permite apreciar a presença de:

- Elementos celulares
- Microrganismos (bactérias, fungos e parasitas)

1.1.3. COLORAÇÕES

O exame microscópico de preparações coradas permite precisar as **características morfológicas das bactérias** (forma e afinidade para os corantes):

Coloração SIMPLES - AZUL de METILENO

Reagentes

Solução de azul de metileno:

- Solução alcoólica, saturada, de azul de metileno – 300 ml
- Solução aquosa, a 0,01% de hidróxido de potássio – 1000 ml

- Cobrir o esfregaço, correctamente fixado, com solução de azul de metileno durante 3 minutos.
- Lavar com água corrente e secar

Coloração DIFERENCIAL - Método de GRAM

Reagentes

Solução de violeta cristal:

- violeta de cristal - 2 g
- álcool etílico a 95% - 20 ml
- oxalato de NH₄ - 0.8 g
- água destilada - 100 ml

Lugol:

- iodeto de potássio – 2 g
- cristais de iodo – 1 g
- água destilada – 100 ml

Descorante (álcool-acetona):

- acetona - 50 ml
- álcool etílico a 95% - 50 ml

Contra-coloração:

- safranina O - 2.5 g
- álcool etílico a 95% - 100 ml
- Juntar 10 ml desta solução a 100 ml de água destilada

- Cobrir o esfregaço já fixado, com **solução de violeta de cristal durante 1 minuto**.
- Lavar com **lugol** e deixar actuar durante 1 minuto.
- Lavar com água corrente.
- Descorar com **álcool acetona** até que não saia mais cor violeta do esfregaço.
- Lavar com água corrente
- Cobrir a superfície com solução de **contra-coloração** (safranina, fucsina diluída etc.) durante 1 minuto.
- Lavar com água corrente e deixar secar.
- **As bactérias Gram positivo coram de roxo escuro e as Gram negativo de vermelho**

Coloração para detecção de ÁCIDO ÁLCOOL RESISTÊNCIA

1. Coloração de ZIEHL- NEELSEN

Reagentes

Fucsina de Ziehl:

- fucsina básica em pó – 5 g
- fenol cristalizado – 25 g
- álcool absoluto – 50 ml
- água destilada – 500 ml

Colocar a fucsina e o fenol num balão e aquecer em banho de água fervente durante 5 min, com agitação frequente. Depois de completa dissolução, adicionar álcool e agitar bem. Juntar, por fim, a água destilada e filtrar antes de usar.

Descorante:

- álcool etílico 95% - 97 ml
- ácido clorídrico concentrado (37%) – 3 ml

Azul de metileno (já descrito)

- Cobrir a lâmina com solução de fucsina e **aquecer até à emissão de vapores**. Deixar actuar durante 10 minutos.
- Lavar com água
- Cobrir com solução descorante (álcool-ácido) cerca de 1 minuto.
- Lavar com água
- Corar com azul de metileno durante 15- 20 Seg.
- Lavar e deixar secar

2. Coloração de KINYOUN

Reagentes

Carbolfucsina de Kinyoun:

- Solução 1: dissolver 4 g de fucsina básica em 20 ml de etanol a 95%
- Solução 2: dissolver 8 g de cristais de fenol em 100 ml de água destilada. É necessário aquecimento.
- Solução de trabalho: Combinar as soluções 1 e 2

Álcool- ácido a 3% : Juntar cuidadosamente 3 ml de ácido clorídrico concentrado (37%) a 97 ml de etanol a 95%

- Cobrir a lâmina com a solução de carbolfucsina de Kinyoun e **deixar actuar 5 minutos**
- Lavar com água
- Cobrir a lâmina com **álcool-ácido a 3%** e deixar actuar 2 minutos
- Lavar com água e retirar o excesso
- Cobrir a lâmina com contra-coloração (ex. azul de metileno) e deixar actuar 1-2 min.
- Lavar com água e deixar secar

3. Coloração da AURAMINA

Reagentes

Solução corante:

- Auramina O - 0.3 g
- Fenol - 3 g
- Água destilada – 97 ml

Dissolver o fenol na água morna; juntar a auramina pouco a pouco agitando vigorosamente até à dissolução; filtrar e conservar em frasco de vidro escuro bem vedado.

Ácido- álcool a 3%

Solução de permanganato de potássio:

- permanganato de potássio – 1 g
- água destilada – 1000 ml

- Cobrir o esfregaço fixado com solução de auramina, durante **15 minutos**.
- Lavar com água corrente.
- Descorar, durante 5 min, com o álcool- ácido e lavar com água corrente.
- Tratar com permanganato durante 30 segundos.
- Lavar de novo e deixar secar.

1.1.4. MORFOLOGIA BACTERIANA

As bactérias têm 4 formas principais:

- redonda (cocos)
- alongadas ou em bastonete (bacilos)
- curva (vibrião)
- espiralada (espirilo)

1.2- DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS EM CULTURA

1.2.1. MEIOS DE CULTURA

- **Classificação dos Meios de cultura**

Os meios podem ser:

- **Líquidos**
- **Sólidos** (com 1,5% de agar)
- **Semi- sólidos** (com 0,5% de agar)

Tipos de Meios de cultura

- **Meios SELECTIVOS** (ex.: MacConkey, Hektoen).
 - **Meios NÃO SELECTIVOS** (ex.: Gelose com sangue)
 - **Meios DIFERENCIAIS** (MacConkey)
- A **técnica utilizada para preparar** os meios é muito importante para obter um meio de boa qualidade (devem ser seguidas escrupulosamente as indicações de cada fabricante).

1. Meio BRAIN-HEART

- **Classificação** – meio não selectivo
- **Princípio:**
 - A adição de **sangue** permite o isolamento de bactérias exigentes.
 - Utiliza-se geralmente como meio de enriquecimento ou meio base para hemoculturas.
 - A adição de 5-10% de **sangue, antibióticos como cloranfenicol e gentamicina**, tornam o meio selectivo para fungos.

2. GELOSE COLUMBIA

- **Classificação** - meio não selectivo
- **Princípio** - meio base que com a adição de substâncias específicas, sangue ou agentes selectivos, origina meios de cultura especiais para multiplicação, isolamento ou identificação de microrganismos

2.1. Gelose COLUMBIA com SANGUE

Gelose Columbia à qual se junta sangue desfibrinado de carneiro ou cavalo, a uma temperatura de 45° C. Pode tornar-se selectivo quando adicionados agentes inibidores. Permite a observação da presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise.

2.2. Gelose COLUMBIA com sangue, colistina e ácido nalidíxico (CNA)

A colistina e o ácido nalidíxico inibem o crescimento das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. o que torna o **meio selectivo para bactérias Gram positivo**, contudo algumas bactérias Gram negativo como *Gardnerella vaginalis* e alguns *Bacteroides* spp. também se desenvolvem.

2.3. Gelose CHOCOLATE

Meio enriquecido, não selectivo obtido a partir da gelose Columbia, pelo aquecimento da mistura com **sangue a 80°C** (hemólise dos eritrócitos). Favorece o crescimento de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp.

- **Agentes selectivos:**

1. **Gelose chocolate com V.C.A.T. (vancomicina, colistina, anfotericina e trimetropim)** – com incubação a 35°C em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂, permite o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* em amostras com flora indígena.
2. **Gelose chocolate com bacitracina** – favorece o crescimento de *Haemophilus* spp. nos produtos com flora mista devido à inibição das bactérias Gram positivo e maioria das *Neisseriaceae*.

3. Meio de CHAPMAN(MANITOL SALGADO)

- **Classificação** - meio selectivo para o isolamento de *Staphylococcus* spp., e identificação presuntiva de *S. aureus*.
- **Princípio** - A elevada concentração de NaCl inibe a maior parte dos Gram negativo permitindo o isolamento de *Staphylococcus* spp. A fermentação do manitol permite o diagnóstico presuntivo de *S. aureus*.

4. C.L.E.D. (Cistina- Lactose - Deficiente de Electrólitos)

- **Classificação** - meio não selectivo, diferencial, habitualmente utilizado para cultura de amostras de urina, que permite o isolamento dos agentes mais frequentes de infecção urinária e quantificação de colónias.
- **Princípio** - a deficiência de electrólitos inibe o “swarming” dos *Proteus* spp. e a lactose permite diferenciar os fermentadores dos não fermentadores.

5. GELOSE HEKTOEN

- **Classificação** - meio selectivo diferencial para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.
- **Princípio** - os sais biliares **inibem os Gram positivo e retardam o crescimento** de algumas *Enterobacteriaceae*.

6. MEIO de MacCONKEY

- **Classificação** - meio selectivo e diferencial para isolamento de bacilos Gram negativo (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. etc.)

- **Princípio** – Os sais biliares inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram positivo. A presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras.

7. MEIO SS (Salmonella Shigella)

- **Classificação** - meio selectivo e diferencial de isolamento para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.
- **Princípio** - Inibição dos “coliformes” pelo verde brilhante e sais biliares. A presença de sais de ferro permite a detecção das estirpes produtoras de SH₂.

8. MEIO de SELENITO

- **Classificação** - meio líquido de enriquecimento para *Salmonella* spp.
- **Princípio:**
 - O selenito de sódio inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*, incluindo algumas estirpes de *Shigella* spp.
 - Utilizado para pesquisa nas fezes (coprocultura): - A subcultura para meio sólido deve ocorrer entre as **6 e 12 horas**, pois esse é o prazo médio de inibição de outras estirpes, tal como o *Proteus* spp.

9. CALDO GN

- **Classificação** - meio líquido de enriquecimento para *Enterobacteriaceae*, especialmente *Shigella* spp e *Salmonella* spp.
- **Princípio:**
 - O citrato e o deoxicolato actuam como agentes selectivos e inibem o crescimento da maioria das *Enterobacteriaceae* da flora indígena habitual do intestino e todos os tipos de bacilos formadores de esporos.
 - O manitol promove selectivamente o crescimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. que o metabolizam.
 - Utilizado para pesquisa nas fezes (coprocultura): - A subcultura para meio sólido deve ocorrer entre as **6 e 12 horas**, pois esse é o prazo médio de inibição de outras estirpes, tal como o *Proteus* spp.

10. MEIO de MULLER - HINTON

- **Classificação** - meio não selectivo usado principalmente para o estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos.

1.2.2. TÉCNICAS DE SEMEITEIRA

Devem utilizar-se meios não desidratados, mas cuja superfície esteja seca e sem gotículas de condensação na tampa.

- **Meio SÓLIDO em PLACA**

- **Por quadrantes ou em roseta** - Colocar uma pequena porção de produto (inoculo) num quadrante e proceder à sementeira com a ansa.
- **Por inundação, com pipeta** (método não recomendado devido a produção de aerossóis; quando utilizado deve ser realizado em câmara de segurança biológica).
- **Por espalhamento com zaragatoa** - utilizar para execução de TSA por difusão em placa (ver técnica no capítulo sobre testes de susceptibilidade).
- **Para quantificação de colónias** (urina) – utilizar ansa calibrada (de 10 µl).

- **Meio SÓLIDO em TUBO**

Pode-se inocular:

- Só em superfície
- Ou em superfície e em profundidade



Técnica para inoculação em superfície e em profundidade em tubo com rampa de gelose (A→B)

- **Em meio LÍQUIDO**

- Produto líquido - semeado com auxílio de seringa ou pipeta
- Produto sólido - é mergulhado directamente no meio

1.2.3 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

- **Atmosfera**

- Estão disponíveis comercialmente geradores que permitem obter as diferentes atmosferas necessárias para a cultura de microrganismos patogénicos em laboratório:
 - **CO₂**
 - **Microaerofília**
 - **Anaerobiose**
- Existem geradores para jarras ou para sacos (de 2 placas de Petri).
- Se não houver este tipo de geradores pode-se obter atmosfera de CO₂ colocando uma vela acesa dentro de uma jarra de vidro fechada, juntamente com as placas.

- **Temperatura**

- Existe uma temperatura óptima para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos, que ronda os 35-37°C.
- Alguns podem desenvolver-se a temperaturas mais baixas, como a *Listeria* spp. (4°C), e outros a temperaturas mais elevadas, como o *Campylobacter* spp. (42°C).
- Provavelmente mais importante que a temperatura de incubação é a **prevenção de grandes flutuações na mesma.**

- **Humidade**

- A maioria dos microrganismos tem desenvolvimento otimizado com uma humidade igual ou superior a 70%.
- Os meios de cultura têm de se manter hidratados durante o período de incubação.
- Para manter a humidade numa estufa normal, pode colocar-se um recipiente com água no seu interior que permita a sua evaporação.

1.3. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

1.3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A decisão do modo de processamento do exame cultural e valorização clínica das estirpes isoladas, baseia-se na compreensão da patogenia da infecção nos diferentes locais anatómicos.
- **Só se deve realizar a identificação e TSA de colónias isoladas.**
- Isolamento da mesma espécie de microrganismo em amostras idênticas colhidas em dias sucessivos, não é necessário proceder à sua identificação e TSA.
Se a segunda amostra tem um intervalo de cinco ou mais dias é necessário identificação e antibiograma, pois pode ter havido alteração da flora ou do padrão de susceptibilidade.

1.3.2. Aspecto MACROSCÓPICO das COLÓNIAS

- Forma
- Dimensão
- Elevação
- Margem (bordo da colónia)
- Superfície
- Consistência
- Produção de pigmento

1.3.3. IDENTIFICAÇÃO BASEADA EM CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

1. TESTE da POTASSA

Reagentes

- Hidróxido de potássio – 3 g
- Água destilada para 100 ml

- **Princípio** – A parede das bactérias Gram negativo é facilmente rompida por uma solução alcalina diluída e os restos de DNA libertados permanecem agregados na suspensão, apresentando a formação de um filamento. Nas bactérias Gram positivo, por a parede celular ser mais resistente, não apresentam este aspecto.
- **Procedimento**
 - Coloca-se uma gota de **KOH a 3%** numa lâmina e faz-se uma suspensão, bem homogeneizada, com uma ansa, elevando-se várias vezes 1- 2 cm.
 - Se, ao elevar a ansa, se observa a formação de um fio a reacção é positiva, indicando a presença de um microrganismo Gram negativo. (**Reacção positiva**)

2. TESTE da CATALASE

Reagentes

- peróxido de hidrogénio a 3% (conservar à temperatura ambiente e no escuro)

- **Princípio** – O enzima catalase desdobra o peróxido de hidrogénio (3%) em água e oxigénio ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)
- **Procedimento**
 - Com a ponta de uma pipeta de Pasteur ou com palito, transferir a colónia em estudo para a lâmina de vidro.
 - Adicionar uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% e observar imediatamente se existe ou não formação de bolhas de ar (**Reacção positiva**). É possível também fazer esta prova pela ordem inversa.
- **Limites e Precauções:**
 - Culturas com mais de 24h podem dar falsos negativos.
 - Devido à existência de catalase nos eritrócitos, a prova deve ser interpretada com muito cuidado quando efectuada a partir de colónias retiradas de meios contendo sangue (possibilidade de falso positivo).

3. TESTE da COAGULASE

A coagulase é uma enzima termoestável produzida principalmente pelas estirpes de *S. aureus*. Existem duas formas de coagulase: uma “ligada à parede celular” ou “Factor clumping” e outra libertada pela célula bacteriana que é a “coagulase livre”.

3.1. Teste da Coagulase em LÂMINA

Reagentes

- Plasma de coelho citratado ou com EDTA (fornecido comercialmente desidratado).
- Após reconstituído deve ser refrigerado

- **Princípio** – A “coagulase ligada” ou “Factor clumping” actua directamente no fibrinogénio plasmático e causa aglutinação das bactérias em agregados visíveis.
- **Procedimento:**
 - Preparar uma suspensão de colónias densa e bem emulsionada em água destilada.
 - Agitar no vortex e colocar uma gota de suspensão na lâmina.
 - Adicionar uma gota do plasma de coelho.
 - Observar a existência ou não de aglutinação nos 10 a 15 segundos imediatos sem agitar a lâmina. (**Reacção positiva**)
- **Limites e precauções:**
 - Um teste da coagulase em lâmina positivo **só é válido para estirpes de *Staphylococcus spp.* que não apresentem autoaglutinação**. A autoaglutinação é pesquisada efectuando uma suspensão de colónia numa gota de NaCl a 0,85% colocada numa lâmina de vidro. A existência de aglutinação é considerada uma reacção positiva de autoaglutinação e invalida a interpretação do teste da coagulase em lâmina. Perante esta situação utilizar teste alternativo.
 - Não utilizar colónias provenientes de meios com alto teor em NaCl.

3.2. Teste da Coagulase em TUBO

Reagentes

- Plasma de coelho citratado ou com EDTA (fornecido comercialmente desidratado).
- Pode ser refrigerado durante 10 dias ou congelado em tubos individuais durante vários meses

- **Princípio** - a coagulase livre (libertada pelas células) actua na protrombina originando uma substância semelhante à trombina, “trombina livre” que actua no fibrinogénio formando um coágulo de fibrina
- **Procedimento:**
 - Num tubo com 0,5 ml do plasma de coelho inocular uma colónia isolada da cultura em estudo.
 - Incubar a 35- 37º C.
 - Ao fim de 4h de incubação e sem agitar o tubo, verificar se existe formação de coágulo. (**Reacção positiva**)
 - A ausência de coágulo às 4h implica a reincubação do tubo com leitura às 24h.

- **Limites e precauções:**

- Pode ocorrer lise do coágulo antes da sua observação por produção de enzimas fibrinolíticos pela estirpe em estudo. (Falso negativo)

3.3. **Proteína A (Staphaurex®):**

A maioria dos *S. aureus* produzem proteína A que tem afinidade específica para o fragmento Fc da imunoglobulina G. A pesquisa de proteína A é um método alternativo ao teste da coagulase em lâmina.

- **Princípio:**

- Partículas de latex revestidas de plasma humano contendo imunoglobulina G e fibrinogénio reagem quer com o factor de aglutinação (factor clumping) quer com a proteína A originando aglutinação.
- Existem vários testes comercializados.

- **Procedimento** - efectuar a técnica segundo instruções do fabricante.

- **Limitações e precauções:**

- *S. hyicus* e *S. intermedius* podem dar uma reacção positiva mas são raramente isolados como agentes de infecção no ser humano.
- *S. saprophyticus* podem dar uma reacção positiva, pelo que quando se trata de estirpe isolada de urina tem de ser identificada por outro método.
- Espécies de *Micrococcus* spp., *E. coli*, *C. albicans*, *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. podem também originar aglutinação.
- Algumas estirpes de *S. aureus* resistentes à metilina podem não aglutinar.

4. **TESTES da DEOXIRRIBONUCLEASE (DNase)**

- **Princípio** - O *S. aureus*, como outras bactérias como p. ex. *Moraxella catarrhalis* ou *Serratia marcescens*, produzem a enzima Dnase.

- **Procedimento:**

- O microrganismo a testar é semeado em estria central no agar DNase
- Após uma incubação de 18 a 24h, a placa é coberta com HCl 1M para precipitar o DNA não hidrolizado
- Um resultado positivo é indicado pela transparentização do agar em volta das colónias.
- O DNA não hidrolizado aparece mais opaco (pela precipitação causada pelo ácido)

5. CITOCROMO OXIDASE

Reagentes

- tetrametil-p- fenilenediamina dihidroclorato 1% (reagente de Kovac)

- **Princípio:**

- As citocromo-oxidases são hemoproteínas que actuam como elo final na cadeia de respiração aeróbia transferindo electrões (hidrogénio) para o oxigénio, com formação de água.
- O teste utiliza um corante que substitui o oxigénio como aceitador de hidrogénio (→aparecimento de cor).

- **Procedimento:**

- **Técnica directa em placa** - colocar 2-3 gotas de reagente sobre colónias isoladas da bactéria a testar.
- **Técnica indirecta sobre tira de papel** - utilizam-se tiras comerciais ou um papel de filtro onde se colocam algumas gotas de reagente. Com uma ansa (não metálica) retira-se uma colónia a testar que é colocada sobre o papel.

- **Interpretação:**

- As colónias com bactérias que contenham a actividade da enzima desenvolvem uma **cor azul-roxo escura** em mais ou menos 10 segundos.

- **Limitação:**

- Não devem ser usadas ansas de metal pois os produtos de oxidação do metal, que se formam aquando do aquecimento da ansa, podem provocar falsa reacção positiva.

6. TESTE da SOLUBILIDADE na BÍLIS

Reagentes

- Solução de desoxicolato de sódio

- **Princípio** - os sais biliare têm a capacidade de lisar selectivamente o *S. pneumoniae*.

- **Procedimento** - colocar algumas gotas de reagente em colónias suspeitas.

- **Interpretação** - o resultado é positivo (*S. pneumoniae*) se houver lise completa das colónias e seu desaparecimento em ± 30 min.

- **Limitação:**

- Se for utilizada gelose sangue, aparece uma zona pronunciada de hemólise em volta da gota de reagente que não deve ser confundida com lise bacteriana.

7. TESTE do INDOL DIRECTO

Reagentes

Reagente de Kovac:

- paradimetilaminobenzaldeído (PDABA) – 5 g
- álcool isoamílico – 75 g
- ácido clorídrico (37%) – 25 ml
- Aquecer o PDABA com álcool isoamílico a 50 – 60° C até dissolver
- Arrefecer e adicionar o ácido clorídrico lentamente e sempre em banho de água fria (não pode mudar a cor para rosa)

• **Princípio:**

- O indol é um dos produtos de degradação metabólica do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolizar e desaminar o triptofano com a produção de indol, ácido pirúvico e amónia.
- O teste é baseado na formação de uma cor vermelha quando o indol reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído. Este é o químico activo dos reagentes de Kovac e Ehrlich. Deve ser usado um meio rico em triptofano

• **Procedimento:**

- Impregnar uma tira de papel de filtro com o reagente
- Com uma ansa retirar uma colónia da bactéria a testar e colocá-la sobre o papel

• **Interpretação:**

- Desenvolvimento imediato de **cor vermelha** → teste positivo

PROVAS BIOQUÍMICAS

O seu estudo reduz-se a alguns aspectos principais:

- **Assimilação dos nutrientes:** os nutrientes assimiláveis podem variar consideravelmente de uma espécie bacteriana para outra, indo de substâncias mais simples às moléculas orgânicas mais complexas.
- Reacções que levam à **síntese dos constituintes** da célula bacteriana: prótidos, glúcidos, lípidos.
- Reacções que **fornece a energia necessária** ao metabolismo.
- **Enzimas** – detecção da sua produção. (Sem os importantes sistemas de exo e endoenzimas as reacções de catabolismo e anabolismo não seriam compatíveis com a vida).

Para efeitos práticos de identificação, actualmente, o estudo repousa nos efeitos globais ou pontuais do catabolismo e sobretudo sobre a caracterização de enzimas diversos.

Estes testes encontram-se disponíveis isoladamente ou integrados em sistemas comercializados de identificação microbiana. Nomeadamente, alguns dos mais comuns e mais utilizados:

1. REDUÇÃO dos NITRATOS
2. ORTONITROFENIL-GALACTOSIDASE (ONPG)
3. TESTE do INDOL
4. TESTE do VERMELHO de METIL
5. TESTE de VOGES - PROSKAUER
6. Utilização do CITRATO
7. TESTE da UREASE
8. DESCARBOXILASES
9. FENILALANINA DESAMINASE
10. TESTE FERMENTATIVO OXIDATIVO / Prova de Hugh e Leifson
11. TESTE da HIDRÓLISE do HIPURATO
12. TESTE da BILE-ESCULINA

OUTROS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. TESTE da OPTOQUINA:

Reagentes

- Placa de gelose com 5% de sangue
- Disco de 5 µg de optoquina

- **Princípio** - A optoquina é uma substância que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição da cultura em placa.
- **Procedimento:**
 - Usando uma ansa, seleccionar 1 colónia bem isolada do microrganismo a ser testado e semear numa placa de gelose sangue em duas ou mais direcções perpendiculares numa área de 3 cm de diâmetro.
 - Colocar o disco de optoquina no centro da área semeada.
 - Incubar 18 a 24h a 35° C em CO₂.
- **Interpretação** - O crescimento do ***S. pneumoniae*** é caracteristicamente inibido pelo disco de optoquina produzindo um halo ≥ 19 mm.

2. TESTE de SUSCEPTIBILIDADE à NOVOBIOCINA

- **Princípio** - O *S. saprophyticus* é resistente à novobiocina (disco de 5µg); outras estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa com significado clínico são susceptíveis.
- **Procedimento:**
 - Efectuar uma suspensão (0,5 MacFarland) da colónia em estudo em NaCl a 0,85%, e inocular em placa de Muller-Hinton (ver procedimento para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos)
 - Colocar o disco de novobiocina na placa.
 - Incubar 16 a 18h a 35° C em aerobiose.
 - Examinar e medir o halo de inibição em volta do disco.

- **Interpretação** – uma zona de inibição ≤ 16 mm indica resistência e identifica presuntivamente *S. saprophyticus*.

3. TESTE de SUSCEPTIBILIDADE à BACITRACINA

Reagentes

- Disco de Bacitracina a 0,04 U
- Placa de gelose sangue

- **Princípio** - O *Streptococcus β hemolítico* do grupo A é inibido na gelose sangue quando em presença dum disco de Bacitracina a 0,04 U. É um teste de diagnóstico presuntivo.

- **Procedimento:**

- Semear com ansa em duas ou mais direcções perpendiculares uma placa de gelose sangue a partir de colónia β hemolítica.
- Aplicar o disco de Bacitracina.
- Incubar 16- 18h a 35° C.
- Verificar a existência de halo de inibição.

- **Interpretação:**

Qualquer **halo de inibição** indica **identificação presuntiva de *Streptococcus β hemolítico do grupo A***. A ausência de halo de inibição é interpretada como *Streptococcus β hemolítico* não grupo A

- **Limitações:**

- O teste só deve ser efectuado em colónias de *Streptococcus* com β -hemólise. Os *Streptococcus* que apresentam α , γ ou δ hemólise podem ser inibidos pela bacitracina.
- Há estirpes de *Streptococcus β -hemolítico* do grupo A que são resistentes à bacitracina.

2. CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS E ESTIRPES BACTERIANAS

MEIOS DE TRANSPORTE de PRODUTOS BIOLÓGICOS

- A sua utilização tem como objectivo permitir a viabilidade dos microrganismos nos produtos biológicos quando não podem ser processados imediatamente após a colheita. Devem ser utilizados de acordo com o produto e os microrganismos que se pretendem pesquisar.
- **Meio de Stuart, meio de Amies com ou sem carvão, Meio de Cary-Blair, etc.** - meios de transporte, não nutriente, que visam manter intactos os microrganismos até, geralmente, às 24 horas. A sua selecção depende do produto biológico. Algumas características destes meios:
 - A ausência de compostos nitrogenados impede o crescimento de microrganismos.

- Os hidratos de carbono fornecem energia, permitindo a sobrevivência dos microrganismos.
- Os meios de transporte para a pesquisa de bactérias anaeróbias têm um indicador de anaerobiose - o azul de metileno (se houver entrada de ar o meio fica azul nos 2/3 inferiores).
- Se houver suspeita de *N. gonorrhoeae* devem ser usados meios contendo carvão, com o objectivo de neutralizar substâncias inibidoras.

CONSERVAÇÃO de ESTIRPES BACTERIANAS

1- Períodos CURTOS

A maior parte das bactérias de crescimento rápido podem ser conservadas durante 1 a 2 semanas em placas de agar simples hermeticamente fechadas, invertidas e a 4°C, ou em tubos de agar inclinado.

2- Períodos LONGOS

a- Meios de conservação

- A maior parte das bactérias de crescimento rápido podem ser mantidas em tubos de conservação durante muito tempo à temperatura ambiente e ao abrigo da luz (depende da estirpe, do meio utilizado, do grau de humidade, etc.). O meio de conservação é inoculado por picada profunda, podendo ou não necessitar de prévia incubação antes do armazenamento. Conservar hermeticamente fechado.
- Pode usar-se **Meio de gelose peptonada**:
 - Extracto de carne 5 g
 - Peptona 10 g
 - NaCl 3 g
 - (Na)2HPO₄.2H₂O 2 g
 - Agar- 10 g
 - H₂O -1000 ml
 - Acertar o pH a 7,4.
- Esterilizar a 121°C durante 20 minutos

b- Congelação

- A - 70°C em **TSB** (meio de tripticase-soja) ou outro caldo nutritivo (p.ex.: Brain Heart Infusion) **adicionado de 15 a 18% de glicerol**.

c- Liofilização

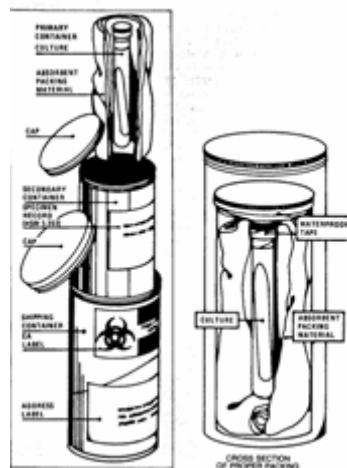
- A maior parte das estirpes podem ser liofilizadas, tendo em consideração que este procedimento pode alterar algumas características dos microrganismos (p.ex. resistência a antimicrobianos).
- As estirpes esporuladas não podem ser sujeitas a liofilização

EMBALAGEM DE TRANSPORTE DE PRODUTO BIOLÓGICO OU ESTIRPES BACTERIANAS

1. **Recipiente primário** - recipiente de polipropileno ou polietileno (não se recomenda o vidro), fechado hermeticamente.
2. **Recipiente secundário** - com as mesmas características do primário.
3. **Material absorvente** - entre o recipiente primário e secundário. Pode utilizar-se algodão hidrófilo. A quantidade deve ser suficiente para absorver o dobro do conteúdo completo do recipiente primário.
4. **Recipiente exterior** - deve ter resistência suficiente de acordo com a sua capacidade, massa e uso desejado e deverá ser capaz de suportar pesos e golpes, que frequentemente têm lugar durante a sua manipulação e transporte. Não devem utilizar-se envelopes acolchoados para o envio de amostras.

• Sinalização, etiquetagem e documentação

- O pacote exterior deverá ter o nome do remetente, a informação de que se trata de substância infecciosa com risco humano e o nome e direcção do destinatário.
- A informação sobre o material (como p. ex. os dados clínicos ou bacteriológicos) deverão ser colocados entre a embalagem secundária e a exterior.
- Não deve ser colocada informação entre as embalagens primária e secundária.
- É conveniente que a informação que acompanha o produto contenha o nome e número de telefone da pessoa responsável a quem se possa contactar em caso de emergência.



Indicação da constituição de uma embalagem apropriada ao envio de material com risco biológico

3. LIMPEZA, DESINFECÇÃO E ESTERILIZAÇÃO

Definições

- **Limpeza** implica a remoção de sujidade e dos microrganismos. A lavagem com água e sabão remove a maior parte dos microrganismos e ainda as proteínas e outra matéria orgânica a qual, para além de constituir fonte de nutrientes para os microrganismos, protege-os contra a secagem e impede a acção de desinfectantes.
- **Desinfecção** é o processo que destrói ou inactiva microrganismos na forma vegetativa mas geralmente não afecta os esporos bacterianos. Os métodos utilizados podem ser físicos ou químicos.
- **Esterilização** consiste na destruição e eliminação de todos os microrganismos na forma vegetativa e esporulada. Também aqui os métodos utilizados podem ser físicos e/ou químicos.
- **Descontaminação** é o tratamento dado ao material para tornar seguro o seu manuseamento posterior. O processo tem em conta a contaminação consequente à utilização que foi dada ao material e portanto inclui a limpeza e pode ir até à esterilização (p.ex. para priões).

Para facilitar a aplicação destes conceitos ao procedimento antimicrobiano a utilizar, segundo **Spaulding**, o material a ser tratado é classificado em três categorias, de acordo com o risco que representa para o doente:

Classificação de risco infeccioso associado com os dispositivos médicos

Risco	Aplicação do dispositivo	Recomendação
Elevado Material Crítico	<ul style="list-style-type: none">• contacto próximo com solução de continuidade da pele ou mucosas• introduzido em locais estéreis do organismo	Esterilização
Intermédio Material semi-Crítico	<ul style="list-style-type: none">• contacto com mucosas ou,• contaminado com agentes virulentos ou de fácil transmissão cruzada ou,• antes de uso em doentes imunodeprimidos	A desinfecção é geralmente suficiente, embora a esterilização possa ser preferível Limpeza pode ser suficiente em situações especificadas
Baixo Material não Crítico	<ul style="list-style-type: none">• contacto pele intacta• não entra em contacto com o doente	Limpeza

Limpeza

- A limpeza é o pré-requisito essencial da descontaminação e pode constituir um método suficiente para artigos não-invasivos (baixo risco) mas não deve ser utilizado como o único processo para artigos de risco intermédio ou elevado onde haja indicação para desinfecção ou esterilização.

- As indicações da limpeza passam pela descontaminação do ambiente (paredes, pavimentos, mobiliário) e superfícies de trabalho e equipamentos incluindo os dispositivos médicos e outros objectos que entram em contacto com a pele intacta.
- Sempre que possível deve-se preferir os métodos mecânicos já que permitem o controlo e validação do processo. Os processos manuais requerem treino específico e elevado consumo de tempo. Pode ainda haver um risco associado ao manuseamento de material contaminado.

Desinfecção

- Para a desinfecção podem ser utilizados **métodos físicos (calor)** e **químicos (desinfetantes químicos)**.
- A desinfecção pelo calor inactiva todos os microrganismos com excepção dos esporos bacterianos, alguns vírus resistentes ao calor e o *Cryptosporidium*. Está indicado para os dispositivos que tolerem a exposição repetida ao calor húmido a temperaturas de cerca de 80°-90°C. Processa-se em máquinas de lavagem/desinfecção e têm a vantagem de permitir o controlo e validação do processo.
- Um desinfetante químico é um produto que é capaz de destruir microrganismos por meios químicos ou físico-químicos. Pode ser tóxico, inflamável, corrosivo ou apresentar outras incompatibilidades com os materiais.
- Os factores que podem levar ao insucesso da desinfecção química incluem a resistência inata dos microrganismos, inactivação devido à diluição ou contacto com outras substâncias (ex. matéria orgânica), armazenamento inapropriado.

Actividade microbicida dos desinfetantes químicos

Desinfetante	Esporos	Micobactérias	Bactérias	Vírus
Álcool	0	++	+++	++
Glutaraldeído	+*	+++**	+++	+++
Ortoftaldeído	+*	+++	+++	+++
Outros aldeídos***	+*	+++	+++	+++
Dióxido de cloro	+++	+++	+++	+++
Ácido peracético***	+++	+++	+++	+++
Comp. peroxigenados***	0	+	+++	++
Amónios quaternários***	0	++	++	++
Soro fisiológico superoxidado	+++	+++	+++	+++

0 = nenhuma + = fraca ++ = moderada +++ = boa

* a actividade esporicida dos aldeídos necessita de contacto prolongado (>3 horas)

** há dúvidas sobre a actividade do glutaraldeído sobre algumas micobactérias atípicas

*** a actividade de outros aldeídos, compostos peroxigenados e amónios quaternários varia com a concentração

No laboratório o uso de desinfetantes está indicado para descontaminação de superfícies de trabalho (álcool a 70° ou hipoclorito 1.000 ppm) , **nos recipientes para colocação de material contaminado – pipetas, ansas, etc. (“discard jars”)** (hipoclorito 5.000 ppm) e para remoção de matéria orgânica vertida (hipoclorito 10.000 ppm).

ESTERILIZAÇÃO

- **Esterilização pelo CALOR HÚMIDO** (vapor saturado sob pressão)

É o meio mais seguro para a destruição de todas as formas microbianas através do contacto directo com o vapor dando origem a uma desnaturação proteica da célula. O seu poder de acção está baseado em dois factores: humidade e calor numa câmara de concepção adequada (autoclave ou esterilizador).

Temperatura	Tempo	Humidade relativa
134°C	3 minutos	100 %
121°C	15 minutos	100 %

Os esterilizadores utilizados para os meios de culturas são programados para uma saída lenta do vapor da câmara. Os frascos devem ser encerrados de modo a permitir a entrada do vapor e evitar a condensação. Os frascos/balões são colocados em prateleiras ou cestos de rede ou contentores perfurados para permitir a saída de ar por deslocação para baixo. Para ser eficaz devem ser utilizados pequenos volumes de líquido. Para as culturas deve-se proceder a um arrefecimento lento para evitar a fervura e o extravasamento. A porta do esterilizador não deve ser aberta antes de ser atingida a temperatura de 90º ou 80º conforme se trate de embalagens flexíveis ou de vidro.

- **Esterilização pelo CALOR SECO**

ESTUFA

- O calor seco é utilizado para **materiais de vidro, agulhas, instrumentos delicados de corte, artigos metálicos que não são de aço inoxidável.**
- Fontes de calor - ar quente, chama directa, incineração, microondas, infravermelhos.

<u>Temperaturas</u>	<u>Tempo</u>
• 160º	120 minutos
• 170º	60 minutos
• 180º	30 minutos

- As vantagens deste método são a boa capacidade de penetração (sólidos, líquidos não aquosos e cavidades fechadas, substâncias em pó, ceras) e a não corrosão dos materiais. São desvantagens a necessidade de temperaturas elevadas, exposição prolongada e a penetração heterogénea.

CHAMA

- Limitada às **ansas de inoculação** de culturas bacterianas (actualmente utilizam-se sistemas eléctricos de esterilização ou ansas descartáveis).
- As práticas de “passar à chama” instrumentos, rolhas, bocais dos frascos ou tubos de cultura não assegura a sua esterilização ou protecção contra contaminantes ambientais porque não se atinge uma temperatura suficientemente elevada e o tempo de exposição é

demasiado curto. Estas limitações mantêm-se mesmo quando o artigo é previamente mergulhado em álcool.

FILTRAÇÃO

- A filtração difere dos outros métodos de esterilização porque não envolve a destruição de microrganismos mas a sua remoção através da passagem por filtros sintéticos, granulares ou fibrosos.
- Os líquidos podem ser filtrados para obter esterilidade (p.ex. meios de cultura), avaliar a esterilidade (alguns produtos farmacêuticos) ou colheita de amostra para estudo microbiológico (águas).

• OUTROS MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

- Esta é uma área que tem visto grandes desenvolvimentos nos últimos anos. Para além das radiações muito utilizadas na Indústria para esterilização de material plástico utilizado no laboratório, os métodos de microondas e de infravermelhos têm sido utilizados experimentalmente na esterilização de meios embora a sua utilidade ainda não esteja comprovada para esse fim.
- Na área dos dispositivos médicos, os métodos de esterilização pelo plasma de peróxido de hidrogénio e pelo formaldeído a 2% a baixa temperatura apresentam a vantagem da rapidez em relação ao método mais antigo de esterilização pelo óxido de etileno, porque tem a vantagem de não necessitar do período de arejamento exigido com este último método. Também a esterilização pelo ácido paracético em equipamento fechado é uma opção aceitável para certos equipamentos como os endoscópios flexíveis. Contudo, nenhum destes métodos tem aplicação no Laboratório.

4. TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

Introdução

Segundo DL 310/95 de 22/11 – Resíduos Hospitalares (RH): Resíduos produzidos em unidades de prestação de cuidados de saúde, incluindo as actividades médicas de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença em seres humanos ou animais e ainda as actividades de investigação relacionadas.

Legislação - Despacho 242/96 de 13/8 que classifica os RH em grupos

Objectivos do tratamento de resíduos:

- Redução do seu volume, de maneira a reduzir o espaço necessário à sua eliminação
- Desinfecção ou esterilização, por forma a deixarem de ser fonte de organismos patogénicos e permitir, portanto, a sua manipulação com maior segurança
- Redução e alteração das grandes peças anatómicas de modo a tornarem-se irreconhecíveis e mais esteticamente aceitáveis

Processos de tratamento:

Descontaminação térmica (autoclavagem)

- Pode ser complementado com uma trituração posterior, e/ou com compactação, necessitando sempre de tratamento dos efluentes líquidos e gasosos.

- Utilizado principalmente:
 - Descontaminação de resíduos de laboratórios de microbiologia
 - Resíduos com sangue e líquidos orgânicos
 - Cortantes e perfurantes

NORMAS de COLHEITA e TRANSPORTE de PRODUTOS para EXAME BACTERIOLÓGICO

1. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Microbiologia pode fornecer informação crucial para o diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas suspeitas ou confirmadas. No entanto, só o poderá fazer se as amostras forem de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas adequadamente e acompanhadas por **informação clínica pertinente**. As informações que se descrevem a seguir pretendem servir de orientação para a colheita e transporte de produtos para exame microbiológico.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1. Segurança

- Seguir as **recomendações básicas de segurança** - tratar todos os produtos como potencialmente perigosos.
- *No acto da colheita ou manuseamento do produto, usar luvas, bata, avental e se há risco de produção de “salpicos” é necessário utilizar viseira protectora e/ou máscara.*
- Não contaminar a superfície exterior do recipiente e/ou da requisição acompanhante.
- Minimizar o manuseamento directo dos produtos a enviar ao laboratório. Enviar os produtos em cestos de transporte.
- Os produtos colhidos por aspiração com agulha devem ser transferidos para um recipiente esterilizado. Caso envie o produto em seringa **retirar sempre a agulha**. Fechar a seringa devidamente e identificá-la.
- Por medida de segurança, os recipientes e/ou requisições visivelmente conspurcados com matéria orgânica não devem ser aceites pelo laboratório.
- Sempre que possível, efectuar o processamento do produto em câmara de fluxo laminar.

2.2. Normas Gerais de Colheita

- Se possível, efectuar as colheitas, **antes de iniciar a terapêutica antibiótica**.
- Evitar a contaminação da amostra com a flora saprófita do doente e/ou bactérias do ambiente, de modo a que a amostra seja representativa do local da infecção.
- Utilizar material de colheita e de transporte apropriados e esterilizados.
- Identificar claramente os recipientes e não o invólucro de papel ou plástico com o nome do doente, serviço, n.º de processo, data e hora da colheita e origem do produto biológico.

- Colher o produto em quantidade suficiente para o(s) exame(s) requisitado(s). Quantidade insuficiente pode originar resultados falsamente negativos. Os recipientes para a recolha de produtos líquidos não devem encher-se para além dos seus 2/3 de capacidade. Utilizar **recipientes inquebráveis, esterilizados e de encerramento hermético** e que não permitam ao abrir a formação de aerossóis.
- Deve ser especificada a **natureza do exame pretendido**. Sempre que o exame pretendido não fizer parte da rotina laboratorial, deve ser contactado o Laboratório de Microbiologia.
- Se o produto for colhido através da pele intacta, desinfectar a pele primeiro, de acordo com a política de anti-sépticos do hospital. Prevenir a queimadura pela tintura de iodo removendo o excesso após a colheita.

2.3. Normas Gerais de Transporte

- Transportar rapidamente todos os produtos para o laboratório.
- **Alternativas ao transporte rápido:**
 - **Líquor** – manter na estufa a 35°C
 - **Hemocultura** – manter à temperatura ambiente
 - **Restantes produtos** – refrigerar a 2-8° C
 - **Utilização de Meios de transporte:**
 1. Para pesquisa de **microrganismos muito sensíveis**, tais como a *Neisseria* spp, devem ser colhidos para **meio** de transporte apropriado (com carvão para pesquisa de *N. gonorrhoeae*) e mantidos à temperatura ambiente.
 2. Para **pesquisa de anaeróbios** usar o meio de transporte adequado.
 3. **Fezes** - para exame cultural, enviar em meio de transporte específico (ex.: meio de Cary Blair)
 4. Em todos os produtos sempre que o processamento laboratorial não possa ser efectuado dentro do período de tempo adequado para cada produto.

3. NORMAS DE COLHEITA por LOCAL ANATÓMICO / PRODUTO

3.1. HEMOCULTURA

3.1.1. Técnica de Colheita, Acondicionamento e Transporte

- O sangue deve ser colhido por punção numa veia periférica. É incorrecta a colheita através de catéter I.V.
- Desinfectar o local da punção com álcool a 70% de modo circular e do interior para a periferia.
- Repetir a operação com **solução alcoólica iodada a 1%**, ou seguir a política de anti-sépticos do hospital.
- Deixar o anti-séptico secar.

IMPORTANTE - Não palpar a veia após a desinfecção da pele e antes de inserir a agulha. Se isto acontecer repetir todo o processo de desinfecção.

- Desinfetar a rolha de borracha do frasco com álcool. Aspirar o sangue e inocular o(s) frasco(s), sem mudar de agulha, não ultrapassando a proporção recomendada pelo fabricante.
- Após a colheita, limpar a pele com álcool, para prevenir reacções adversas ao iodo.
- **Nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita. Conservar o frasco em estufa a 37°C até ser enviada ao laboratório (ou à temperatura ambiente nos métodos automáticos se assim fôr recomendado pelo fabricante).**

3.1.2. Volume de sangue

- O volume de sangue é crítico, porque a concentração de microrganismos na maioria das bacteriémias é baixa, especialmente se o doente já está com antibioticoterapia. Nas crianças a concentração de microrganismos durante as bacteriémias é maior que nos adultos pelo que é necessário menos sangue. O volume de sangue recomendado é, em geral:

Crianças – 1 a 5 ml por punção venosa
Adultos – 10 a 30 ml por punção venosa

- O volume de sangue colhido deverá ser repartido pelo n.º de frascos necessários de modo a que a **diluição final seja de 1: 5 a 1:10, respeitando as indicações do fabricante.**

3.1.3. Número e Momento de execução das Hemoculturas

- Habitualmente são suficientes **3 hemoculturas em 24 horas**, colhidas separadamente, sendo o intervalo entre as colheitas variável conforme a situação do doente ou a urgência do início de administração de antibióticos.
- Uma só hemocultura pode levar a que uma bacteriemia intermitente não seja diagnosticada assim como pode dificultar a interpretação do significado clínico do isolamento de certos microrganismos.
- Geralmente a informação adicional obtida com mais de 3 hemoculturas é mínima.
- Para outras informações consultar capítulo respectivo.

3.2. CATETERES INTRAVASCULARES

- O envio de catéter para exame bacteriológico só é aconselhado se existirem sinais de infecção relacionadas com o catéter.

- **Antes** de retirar o catéter, colher sangue para **hemocultura** de uma **veia periférica**, pois só assim será possível valorizar o exame cultural do catéter.
- Desinfetar a pele em redor do catéter, utilizando um anti-séptico de acordo com a política de anti-sépticos do hospital.
- Retirar o catéter; e cortar assépticamente cerca de **3 a 5 cm da porção terminal** e colocá-lo em recipiente esterilizado.
- **Nunca enviar pontas de catéter em meio líquido ou de transporte.**

3.3. BIÓPSIAS CIRÚRGICAS e MATERIAL PROTÉSICO

A colheita é da exclusiva responsabilidade do cirurgião e é enviado em recipiente esterilizado seco ou em meio de cultura líquido, consoante as situações (vidé capítulo respectivo).

3.4. LCR

3.4.1. Volumes mínimos recomendados

- 1 ml para exame bacteriológico
- 2 ml para cultura de fungos
- 3 ml para cultura de micobactérias

3.4.2. Punção Lombar

- Desinfetar o local de colheita com uma solução anti-séptica com álcool, de acordo com a política de anti-sépticos do hospital.
- Colher o líquido para tubo esterilizado, inquebrável, transparente de fundo cónico com encerramento hermético. É recomendada a colheita em **três tubos**, que devem ser numerados, sendo o último, utilizado para exame bacteriológico.
- Enviar o líquido **de imediato** ao laboratório após a colheita.
- **Nunca refrigerar o líquido.**

Nota: Devem realizar-se simultaneamente hemoculturas.

3.5. EXSUDADOS PURULENTOS

3.5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os exsudados de escaras de decúbito e de conteúdo intestinal (ex.: fístulas entero-cutâneas) são amostras que contêm habitualmente uma população bacteriana mista que impede o exame microbiológico fiável, pelo que não devem ser processados, salvo casos especiais.

3.5.2. Lesões (Exsudados) PROFUNDA(O)S

- Descontaminar a pele com solução anti-séptica de acordo com a política de anti-sépticos do hospital.
- Puncionar e aspirar directamente com seringa.
- Colocar a amostra no recipiente esterilizado ou enviar a própria seringa **sem agulha**, mas devidamente fechada.

3.5.3. Lesões (Exsudados) SUPERFICIAIS

- Limpar a superfície da lesão com água destilada ou soro fisiológico esterilizado e **realizar o desbridamento dos tecidos necrosados**.
- Biopsar a base e bordo da lesão e colocar em recipiente esterilizado, de preferência com pérolas de vidro.
ou
- Introduzir uma agulha fina por baixo da camada superficial da lesão e aspirar com a seringa e colocando a amostra no recipiente esterilizado ou enviar a própria seringa **sem agulha**, mas devidamente fechada.
ou
- Com uma zaragatoa esterilizada esfregar toda a base da lesão e colocá-la no meio de transporte adequado.

3.6. URINA

3.6.1. Considerações Gerais

- **Nunca** colher urina de arrastadeira, urinol ou saco de algália.
- **Não** processar pontas de algália.

3.6.2. Métodos de colheita

- Jacto médio
- Punção de catéter urinário
- Punção supra-púbica
- Saco colector em crianças
- Drenagem de nefrostomia /ureterostomia

a) Colheita do jacto médio - Mulher

- Antes de iniciar a colheita efectuar a lavagem higiénica das mãos.
- Com compressas embebidas em água e sabão (**não utilizar anti-sépticos**, pois podem inibir o crescimento dos microrganismos), proceder à lavagem dos órgãos genitais da frente para trás, com uma compressa de cada vez, repetir a operação três vezes.

- Usando o mesmo processo, lavar só com água esterilizada e secar.
- Iniciar a micção, desprezando o primeiro jacto e colher 10-20 cm³ para recipiente esterilizado de boca larga.

b) Colheita do jacto médio – Homem

- Antes de iniciar a colheita efectuar a lavagem higiénica das mãos.
- Afastar o prepúcio e manter essa posição durante toda a colheita.
- Limpar a glândula com compressas embebidas em água e sabão.
- Usando o mesmo processo, lavar agora só com água esterilizada e secar.
- Iniciar a micção, desprezando o primeiro jacto e colher 10-20 cm³ para recipiente esterilizado de boca larga.

c) Punção de catéter urinário - Doente algaliado

- Clampar a algália durante 10-15 minutos, acima da derivação, na zona de borracha.
- Desinfectar com álcool a 70º o local a puncionar.
- Com agulha e seringa esterilizada aspirar a urina (5 a 20 ml).
- Transferir a urina para recipiente esterilizado, ou usar seringa própria para transporte de urina.

d) Punção supra-púbica

- O doente deve ter a bexiga cheia.
- Desinfectar a pele da região supra-púbica com a solução anti-séptica segundo a política de anti-sépticos do hospital.
- Com agulha e seringa esterilizada, puncionar a pele e bexiga ao nível do 1/3 inferior da linha que une o umbigo à sínfise púbica.
- Aspirar a urina e colocá-la em recipiente esterilizado ou enviar na própria seringa após remoção da agulha.

e) Saco colector (utilizado na criança sem controlo dos esfíncteres)

- Lavar com água e sabão a área genital, limpar com água esterilizada e secar com compressa esterilizada.
- Aplicar um saco autocolante estéril.
- Se, ao fim de 30 minutos não tiver urinado, retirar o saco e repetir todo o procedimento anterior;

- Transferir a urina para recipiente esterilizado.

3.7. APARELHO GASTROINTESTINAL

3.7.1. FEZES

3.7.1.1. Exame BACTERIOLÓGICO

- Despiste por rotina de *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter jejunii/coli*.
- Em certos casos e após contacto com o Laboratório: *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio* spp., *E.coli* enterotoxigénica e *Aeromonas hydrophyla*.
- O despiste de *C. difficile* só deve ser efectuado quando solicitado, sendo as fezes colhidas sem meio de transporte.
- Embora tradicionalmente seja aconselhado a colheita até um total de 3 amostras de dejectões diferentes, nos casos agudos uma amostra é quase sempre suficiente.
- **Colheita de fezes** - colher para um recipiente limpo e seco e transferir as fezes para recipiente com meio de transporte apropriado (ex. meio de Cary-Blair), escolhendo a porção com pús, muco ou sangue do tamanho de uma noz.
Não usar papel higiénico para colher as fezes, pois pode conter sais de bário, que são inibitórios

3.7.1.2. Exame PARASITOLÓGICO

- Colher **3 amostras em dias sucessivos, de preferência em dias alternados**.
- Colher as amostras de fezes para recipiente limpo e seco.
- A pesquisa de *Cryptosporidium* spp só se justifica em doentes imunocomprometidos e crianças em casos de diarreia comprovada.

3.7.2. Exsudados rectais

- Utilizado só para a detecção de *Neisseria gonorrhoeae* e na detecção de portadores, para fins epidemiológicos, de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente e *Enterococcus vancomicina-resistente*.
- Introduzir uma zaragatoa estéril 2,5 cm para além do esfíncter anal. Cuidadosamente, rodar a zaragatoa de modo a recolher amostra das criptas anais.
- Enviar a zaragatoa em **meio de transporte** com carvão quando se trate de pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae*.

3.7.3. Biópsias Gástricas

- Usadas para a detecção de *Helicobacter pylori*.
- A colheita é realizada por endoscopia.
- Colocar o fragmento de biópsia no meio de transporte apropriado.

3.7.4. Aspirado duodenal

- Para a detecção de formas vegetativas de *Giardia intestinalis*, larvas de *Strongyloides stercoralis* e *Ascaris lumbricoides*.
- Para pesquisar *Giardia intestinalis*, a colheita deve ser realizada na segunda porção do duodeno.

3.8. APARELHO GENITAL

3.8.1. APARELHO GENITAL FEMININO

3.8.1.1 Exsudado vaginal / endocervical

- Colher com espéculo sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico estéril.
- Com zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron colher a amostra do fundo de saco vaginal posterior e endocolo.
- Colocar a zaragatoa em **meio de transporte com carvão**, que se deve manter à temperatura ambiente.
- Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa para a realização de esfregaços.

3.8.1.2 Exsudado uretral

- Se possível antes da 1ª micção. Se não é possível esperar pelo menos uma hora após a última micção.
- Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gase esterilizada.
- Introduzir na uretra cerca de 2 cm uma zaragatoa fina e flexível, e com um movimento de rotação recolher o exsudado.
- Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa, para a realização de esfregaços.
- Restantes procedimentos idênticos aos do exsudado vaginal.

3.8.1.4. Endométrio

- Enviar a amostra em recipiente esterilizado.
- No caso de suspeita de anaeróbios, colocar em meio de transporte adequado.
- É recomendável realizar simultaneamente hemoculturas.

3.8.1.5. Abcessos (Fundos de saco, Trompas, Gl.Bartholin)

- Colheita por aspiração (no caso da Glândula de Bartholin, descontaminar a pele com anti-séptico não alcoólico).
- Enviar de imediato amostra até 5 ml em recipiente esterilizado. Se suspeitar de anaeróbios utilizar meio de transporte adequado.

3.8.1.6. Úlceras genitais

- *O Laboratório de Microbiologia deve ser contactado previamente.*
- ***Treponema pallidum*** - Limpar a superfície da lesão com gaze humedecida em soro fisiológico. Remover a crosta se presente, evitando sangrar. Pressionar a base da lesão até surgir um fluido claro e colher com uma pipeta Pasteur ou capilar. Colocar uma gota numa lâmina, cobrir com lamela e examinar imediatamente em microscópio de fundo escuro.
- ***Haemophilus ducrey*** - Limpar a superfície da lesão e fazer a colheita por aspiração com uma pipeta Pasteur ou com zaragatoa esterilizada. Semear imediatamente em gelose chocolate enriquecida com suplementos antibióticos.

3.8.1.7. Líquido amniótico

- Enviar rapidamente ao laboratório até 5 ml de amostra em tubo esterilizado e/ou meio de transporte para anaeróbios.

(NOTA – Não realizar exame microbiológico dos dispositivos intra uterinos, “D.I.U.”)

3.8.2. APARELHO GENITAL MASCULINO

3.8.2.1. Exsudado uretral

- A amostra deve colher-se antes da 1ª micção da manhã. Se não for possível, esperar pelo menos uma hora após a última micção.
- Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze esterilizada. Fazer a expressão uretral e introduzir uma zaragatoa fina e flexível até 2 cm dentro da uretra. Recolher o exsudado com um movimento de rotação para o exame directo a realizar no acto da colheita. Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa para o exame cultural, que se deve colocar em **meio de transporte com carvão** e manter à temperatura ambiente até ao envio para o laboratório.

3.8.2.2. Exsudado rectal

- Procedimento idêntico ao do aparelho genital feminino.

3.8.2.3. Abscessos (Epidídimo, Próstata, Testículos)

- Colheita cirúrgica.
- Introduzir o aspirado, até 5 ml, no meio de transporte apropriado.

3.8.2.4. Úlceras genitais

- Procedimento idêntico ao do aparelho genital feminino.

3.8.3. AMOSTRAS PARA O ESTUDO DE *CHLAMYDIA* E DE *MYCOPLASMA*

Para o estudo da *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma* devem seguir-se as indicações de cada fabricante, já que a colheita de amostras, meios de transporte e conservação dependem da técnica utilizada.

3.8.3.1. *Chlamydia trachomatis*

- Os métodos culturais são mais sensíveis e específicos, mas devido à sua complexidade e custo não são efectuados na rotina da maior parte dos laboratórios.

- Os métodos não culturais incluem a pesquisa de corpos elementares, antigénios, ác. nucleicos, por técnicas de imunofluorescência directa, EIA ou sondas de ác. nucleicos. Nas técnicas de imunofluorescência, os esfregaços são realizados no momento da colheita.
- As amostras adequadas **não** são as secreções vaginais, mas sim os raspados, já que a *Chlamydia trachomatis* se encontra nas células do epitélio cilíndrico.
- **Esfregaço endocervical e uretral**
 - Remover o excesso de muco.
 - Inserir uma zaragatoa própria no canal endocervical ou uretral e rodar.
 - Evitar contacto com a mucosa vaginal.
 - Transportar e conservar a amostra de acordo com a informação do fabricante.
 - Para a colheita uretral, o doente **não** deve urinar pelo menos 1 hora antes da colheita.

3.8.3.2. Mycoplasma / Ureaplasma

- Exsudado vaginal, cervical ou uretral
- Colher a amostra com zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron e proceder de acordo com as indicações do fabricante

3.9. EXSUDADO OCULAR

3.9.1. Considerações gerais

- Enviar sempre e em separado amostra dos dois olhos, indicando na requisição o lado da infecção.
- Nos recém-nascidos, efectuar sempre esfregaço em lâminas.

3.9.2. Colheita

- Com uma zaragatoa de algodão ou de alginato de cálcio na conjuntiva tarsal inferior e no fornix do olho e colocá-la no meio de transporte apropriado.

3.9.3. Pesquisa de *C. trachomatis*

- Solicitar ao Laboratório o material de colheita e seguir as instruções do fabricante. Colher antes de instilar qualquer anestésico.

3.10. APARELHO RESPIRATÓRIO

Considerações gerais

- Para o exame bacteriológico é suficiente 1 única amostra de boa qualidade, apenas para a pesquisa de micobactérias se aconselham 3 amostras em dias consecutivos.

- Se suspeitar de *C. diphtheriae*, *B. pertussis*, *N. gonorrhoeae*, antes de efectuar a colheita, contactar o Laboratório de Microbiologia.

3.10.1. Vias aéreas SUPERIORES

3.10.1.1. Exsudado Faríngeo

- Usado para a detecção de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A. Se solicitado, poderá ser efectuado para pesquisa de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* (despiste de portadores), Angina de Vincent, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*.
- Não obter amostra se existir inflamação da epiglote, pois pode causar espasmos com consequente obstrução respiratória.
- Baixar a língua com espátula.
- Colher com zaragatoa entre os pilares e por detrás da úvula – faringe posterior, amígdalas e qualquer área inflamada ou ulcerada evitando tocar na mucosa bucal e língua.
- Enviar no meio de transporte apropriado ao microrganismo a pesquisar.

3.10.1.2. Exsudado Nasal

- Usado essencialmente para fins epidemiológicos, na detecção de **portadores de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente**.
- Inserir uma zaragatoa estéril em cada narina até encontrar resistência (mais ou menos a nível dos cornetos).
- Rodar a zaragatoa contra a mucosa nasal.
- Colocar, eventualmente em meio de transporte, e enviar rapidamente ao laboratório.

3.10.1.3. Exsudado nasofaríngeo

- Para diagnóstico de *B. pertussis* e detecção de portadores de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A, e *N. meningitidis*.
- Cuidadosamente introduzir uma zaragatoa flexível de alginato de cálcio através do nariz e colocá-la em recipiente esterilizado com o meio de transporte adequado.

3.10.1.4. Aspirado de seio perinasal

- Colheita a efectuar pela O.R.L. Aspiração com agulha de seio maxilar, frontal ou outros seios.
- Colocar em meio de transporte apropriado ao microrganismo a pesquisar.

3.10.1.5. Líquido de timpanocentese

- Produto indicado no diagnóstico da otite média aguda.
- Limpar o canal auditivo externo com soro fisiológico estéril.
- Aspirar com agulha e seringa e enviar em meio de transporte apropriado.
- Se o tímpano estiver perfurado, o exsudado pode ser colhido com zaragatoa.

3.10.2. Vias respiratórias INFERIORES

3.10.2.1. Expectoração

- Preferir a 1ª amostra da manhã em jejum. Lavar a boca e gargarejar só com água antes de iniciar a colheita.
- Instruir o doente para colher expectoração por tosse profunda.
- Colher o produto em recipiente esterilizado, de boca larga de encerramento hermético.

3.10.2.2. Expectoração induzida

- Se o doente não conseguir expectorar esta pode ser induzida por:
 - Cinesioterapia respiratória.
 - Nebulização efectuada apenas com NaCl 0,85% (inalar 20 a 30 ml de uma solução de 3 a 10% de NaCl 0,85% em H₂O).
- Restantes procedimentos iguais aos da expectoração
- *Procedimento **não** recomendado em caso de suspeita de tuberculose.*

3.10.3.3. Secreções brônquicas por aspiração endotraqueal

- Aspirar as secreções e colocar em recipiente esterilizado com tampa de rosca ou tubo de Luken.

3.10.3.4. Amostras colhidas por broncoscopia

- **Lavado brônquico ou Lavado broncoalveolar**
 - Enviar as amostras em recipiente esterilizado com tampa de rosca e hermético, marcando a ordem da colheita (1º, 2º, 3º).
- **Escovado com catéter duplamente protegido**
 - Depois de retirar o catéter exteriorizar a escova da colheita;

- Cortar assepticamente a escova para dentro do recipiente esterilizado com 1 ml de lactato de Ringer.

- **Biópsia brônquica**

- Colocar em recipiente esterilizado com uma pequena quantidade de água destilada esterilizada (evitar a secagem).

- **3.10.3.5. Aspirado transtraqueal**

- Desinfecção correcta da pele no local da punção de acordo com a política de anti-sépticos do hospital.
- Anestesia local e colheita por aspiração.
- Colocar a amostra em recipiente esterilizado ou em meio de transporte apropriado se pretendida cultura para anaeróbios.

- **3.10.3.6. Aspirado pulmonar transtorácico**

- Desinfecção correcta da pele no local da punção de acordo com a política de anti-sépticos do hospital.
- Colheita cirúrgica controlada por TAC.
- Se a lesão for de grandes dimensões ou múltipla colher várias amostras.
- Enviar de imediato ao laboratório a amostra na seringa sem agulha devidamente tapada com dispositivo esterilizado.

- **3.10.3.7. Biópsia pulmonar (toracotomia)**

- Se possível colher 1- 3 mm³ de tecido pulmonar;
- Se a lesão for de grandes dimensões ou múltipla colher várias amostras
- Colocar em recipiente esterilizado.

3.11. LÍQUIDOS de SEROSAS

- **Volumes mínimos recomendados:**

- Exame bacteriológico1 ml
- Exame micológico2 ml
- Exame micobacteriológico.....2 ml

- Desinfetar o local da punção com a solução anti-séptica segundo a política de anti-sépticos do hospital.
- Aspirar com agulha e seringa.

- Colocar a amostra em recipiente seco, esterilizado com tampa de rosca.
- Na pesquisa de anaeróbios, expelir as bolhas da seringa ou colocar o conteúdo em meio de transporte apropriado.
- Eventualmente, quando indicado e protocolado com o laboratório, podem os produtos ser inoculados em frascos para **hemocultura** (segundo procedimento idêntico ao das hemoculturas).

URINA

1. INTRODUÇÃO

As infecções do aparelho urinário são uma das infecções mais frequentes no Homem. A infecção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita, que invade o aparelho urinário por via ascendente através da uretra.

Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos, sem outras doenças associadas, são as **Enterobactereáceas** com grande destaque para a ***Escherichia coli***.

Em doentes internados e com factores de risco como algaliação permanente, tubos de nefrostomia, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, o leque de agentes etiológicos alarga-se a outros microrganismos, como ***Pseudomonas spp***, ***Staphylococcus aureus***, ***Staphylococcus coagulase negativa***, ***Enterococcus spp*** e **fungos**, estes últimos particularmente em doentes que estão sob terapêutica antibiótica.

2. AMOSTRAS

2.2 COLHEITA

A urina é habitualmente um líquido biológico estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir erros na interpretação da urocultura.

Para o diagnóstico de infecção do aparelho urinário são válidas as seguintes amostras de urina (ver capítulo NORMAS de COLHEITA)

1. Micção “jacto médio”
2. Punção de cateter urinário
3. Punção supra-púbica
4. Drenagem de nefrostomia / ureterostomia
5. Saco colector em crianças

- **Urina colhida por micção “jacto médio”**

- O doente deverá colher a primeira urina da manhã, ou se impossível, colher urina após ter estado pelo menos duas horas sem urinar.
- Afastamento dos grandes lábios ou prepúcio.
- Limpeza metódica do meato uretral com gaze embebida em água e sabão.
- Usando o mesmo processo, lavar só com água esterilizada e secar.
- Recolha do jacto intermédio directamente para recipiente esterilizado após desperdiçar a primeira porção do jacto urinário.

- **Urina colhida por punção de catéter urinário (Foley)**

- Clampagem da algália
- Desinfecção do local de punção com soluto anti-séptico
- Aspiração da urina com agulha e seringa
- A urina pode ser enviada na própria seringa, fechada com tampa esterilizada (após remoção da agulha).

Nota - nunca colher urina do saco da algália

- **Urina colhida por punção supra- púbica**

- Desinfecção cirúrgica da pele
- Punção
- Envio da urina na própria seringa

Este método de colheita está particularmente indicado em doentes algaliados nos quais a interpretação de resultados de exames anteriores foi impossível e em crianças nas quais foi também impossível colher urina pelos outros métodos.

- **Urina colhida por drenagem de nefrostomia / ureterostomia**

Quando há um cateter inserido através do flanco do paciente directamente na pélvis renal ou no ureter, a colheita é feita directamente do cateter para recipiente esterilizado.

- **Urina colhida com saco colector em crianças**

- Lavagem dos genitais externos com água e sabão
- Colocar o saco bem adaptado.
- Envio da urina no próprio saco.

2.3. TRANSPORTE

- Após a colheita, a urina deve ser transportada ao laboratório o mais rapidamente possível, uma vez que deverá ser semeada até **uma HORA após a colheita**. Se não for possível, deverá ser refrigerada a 4º C e processada até às 24 horas após a colheita.
- Quando a refrigeração imediata não é possível, a urina deverá ser colhida para recipiente com preservante (ex: ácido bórico) e colocada à temperatura ambiente. Poderá ser processada até 24 horas após a colheita. Neste caso deve ter-se particular atenção ao volume da urina / preservante (possibilidade de falsos negativos quando o volume de urina é muito pequeno).

3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

- **Exame do esfregaço de urina corado pelo GRAM**
 - Colocar **10 µl de urina não centrifugada** e bem homogeneizada, numa lâmina de vidro.
 - Secar ao ar, fixar e corar pelo GRAM.
 - Determinar o número de microrganismos por campo, com objectiva de imersão (100 x) - a presença de 1 ou mais bactérias por campo pode ser correlacionada com uma contagem de colónias de $\geq 10^5$ U.F.C./ ml
- **Exame directo a fresco do sedimento urinário** – observação de elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos ou parasitas no sedimento da urina centrifugada.

3.2. Exame CULTURAL

Meios de cultura - Gelose sangue e MacConkey ou Meio de CLED

- Homogeneizar a urina
- Emergir verticalmente na urina não centrifugada uma ansa calibrada de 1µl
- Semear nos meios apropriados
- Incubar em atmosfera de aerobiose a 35º C, 18 a 24 horas.
- Após a incubação, leitura do n.º de colónias:

1 colónia	10³ UFC / ml
10 colónias	10⁴ UFC / ml
100 colónias	10⁵ UFC / ml

4. INTERPRETAÇÃO dos RESULTADOS

- **Urina colhida por micção “ jacto intermédio “ , por punção de catéter urinário**
 - A valorização dos resultados deverá ter em conta uma série de parâmetros tais como: método de colheita da urina, tipo de doente (por ex.: urológico, geriátrico, etc.), sintomatologia, observação microscópica do sedimento urinário e resultados de exames bacteriológicos anteriores.
 - Se colheita por micção, geralmente quando há crescimento de duas ou mais estirpes bacterianas, considerar que houve uma má técnica de colheita da urina ou um atraso

no transporte e/ou no processamento laboratorial da mesma → requisitar nova colheita de urina.

- Segundo os critérios de Kass, uma contagem de colónias $\geq 10^5$ é significativo de infecção urinária.

- **Urina colhida por saco colector em crianças**

O exame bacteriológico da urina colhida por este método pode dar resultados falso positivos, por provável contaminação com a flora do períneo. Se necessário, estes resultados podem ser confirmados, repetindo a colheita de urina por outro método (ex: punção supra-púbica)

- **Urina colhida por punção supra-púbica**

Excluindo a contaminação por bactérias comensais da pele, deverão ser valorizadas quaisquer espécies de bactérias isoladas, independentemente da sua quantificação.

HEMOCULTURAS

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria das doenças infecciosas podem decorrer com bacteriémia transitória, intermitente, ou persistente (ex. endocardite).

Como o sangue é um produto biológico estéril, **o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção.**

2. AMOSTRAS

2.1 LOCAL de COLHEITA

- A colheita do sangue para hemocultura é efectuada por **punção venosa** de qualquer das veias periféricas.
- Quando são realizadas mais do que uma hemocultura sequencialmente, devem efectuar-se as colheitas em **diferentes veias periféricas**.
- **Não é recomendada a colheita de sangue por punção de cateter I.V.**, excepto quando não é possível a punção de veia periférica (o laboratório deverá ser informado deste facto, essencial para a interpretação do resultado).
- O volume de sangue colhido por frasco deve respeitar a proporção recomendada pelo fabricante em relação ao meio de cultura.

2.2. TÉCNICA de COLHEITA - ACONDICIONAMENTO e TRANSPORTE

DESINFECÇÃO da PELE

- Desinfectar o local da punção com álcool a 70% de modo circular e do interior para a periferia.
- Repetir a operação com **solução alcoólica iodada a 1%**, ou seguir a política de anti-sépticos do hospital.
- Deixar o anti-séptico secar.
- **IMPORTANTE** - *Não palpar a veia após a desinfecção da pele e antes de inserir a agulha, se isto acontecer repetir todo o processo de desinfecção.*
- Desinfectar a rolha de borracha do frasco com álcool. Aspirar o sangue e inocular o(s) frasco(s), sem mudar de agulha, não ultrapassando a proporção recomendada pelo fabricante

- Após a colheita, limpar a pele com álcool, para prevenir reacções adversas ao iodo.
- **Nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita. Conservar o frasco em estufa a 37°C até ser enviada ao laboratório (ou à temperatura ambiente nos métodos automáticos se assim fôr recomendado pelo fabricante).**

VOLUME de SANGUE

O **volume de sangue é crítico** porque a concentração dos microrganismos é baixa na maioria das bacteriémias, principalmente se o doente está sob terapêutica antibiótica. Nas crianças, a concentração dos microrganismos durante o período de bacteriémia é muito mais alta do que nos adultos, por isso são necessários menores volumes de sangue.

Volumes recomendados –

Crianças - 1 a 5 ml por punção venosa

Adultos - 10 a 30 ml por punção venosa

2. 3. NÚMERO e MOMENTO de EXECUÇÃO das HEMOCULTURAS

- **Não colher sangue para hemocultura no pico febril.**
- O número e o intervalo entre as colheitas depende da situação clínica e da urgência que exista para iniciar a antibioticoterapia. Como indicador apresentam-se algumas situações clínicas:

Sepsis, meningite, pneumonia	Colher sequencialmente em locais diferentes 2 a 3 hemoculturas
Febre de origem desconhecida (SFI)	Colher inicialmente 2 a 3 hemoculturas. Se negativas entre as 24h e as 36h, efectuar mais 2 hemoculturas.
Endocardite infecciosa	Efectuar 3 hemoculturas no 1º dia. Se negativas às 24h, repetir colheita de 3 hemoculturas
Doentes com terapêutica antimicrobiana	A colheita deve ser feita imediatamente antes da toma do antibiótico

3. MEIOS de CULTURA

Os meios utilizados devem conter **0,025 a 0,05% de polianetossulfato (SPS)**. O SPS é um anticoagulante que inibe a actividade bactericida do soro, a fagocitose, inactiva o complemento, neutraliza lisozimas e ainda alguns antibióticos da grupo dos aminoglicosídeos. Note-se que há espécies de *Neisseria* que podem ser inibidas pelo SPS.

3.1. Meios de cultura ou sistemas para isolamento de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos

- **Meios líquidos** – Brain heart infusion, Brucella, Columbia, TSB
- **Meios bifásicos** - meio de Castañeda
- **Sistema de Lise - centrifugação** (Isolator®)
- **Meios líquidos para aeróbios de sistemas automáticos**

3.2. Meios de cultura específicos para anaeróbios

- **Meios líquidos** - Thioglicolato
- **Meios líquidos para anaeróbios de sistemas automáticos**

4. PROCEDIMENTOS GERAIS

Recomendações GERAIS - devem ser sempre cumpridas todas as normas de precauções universais quando se manipula o sangue:

1. Utilizar luvas aquando da manipulação de qualquer líquido orgânico.
2. Sempre que possível, efectuar o processamento do produto em câmara de fluxo laminar.
3. Colocar o material contaminado, seringas e agulhas em contentor próprio não perfurável.

4.1. Meios de Cultura e Sistemas NÃO- AUTOMÁTICOS

4.1.1 Meios de cultura líquidos baseados nos meios convencionais

- Ventilar o frasco para aeróbios (havendo assim uma melhor recuperação dos microrganismos aeróbios estritos, p. ex. *Pseudomonas* spp. e fungos leveduriformes):
 - Descontaminar a tampa do frasco com álcool a 70%.
 - Deixar secar 1 a 2 min.
 - Em câmara de fluxo laminar, inserir uma agulha de ventilação para retirar o vácuo.
- Incubar o frasco da hemocultura em atmosfera de aerobiose a 35°C durante **7 dias** ou até 28 dias quando suspeita de diagnóstico de *Brucella*.

4.1.2. Meios de cultura Bifásicos

- O meio utilizado é o **Meio de Castañeda** (fase líquida - TSB e fase sólida - TSA).
- Incubação em atmosfera de aerobiose a 35°C durante 7 dias ou até 28 dias quando suspeita de diagnóstico de *Brucella*.
- Exame macroscópico duas vezes por dia nos primeiros 2 dias e depois diariamente com inversão do frasco para contacto do meio líquido com a gelose.

4.1.3. Sistema de Lise-Centrifugação

- Colheita de 10 ml ou 1,5 ml de sangue consoante a capacidade do tubo (Isolator®).
- Inverter o tubo para misturar o sangue com o líquido de lise.
- Processar nas **8 h seguintes à colheita**.
- As amostras colhidas em tubos de 10ml devem ser centrifugadas, a fim de permitir concentração dos microrganismos (não centrifugar os tubos que contêm 1,5ml de sangue).

- Centrifugar a 3000 g durante 30 minutos.
- Efectuar todos os procedimentos seguintes em câmara de fluxo laminar:
 - Retirar o sobrenadante e concentrar o sedimento em agitador durante 20 seg.
 - Inocular em meios de cultura específicos consoante o pedido do exame.
 - Incubação em diferentes atmosferas, dependendo dos microrganismos a pesquisar.

4.2. Sistemas AUTOMÁTICOS

Existem vários sistemas automáticos comercializados. Todos utilizam para a cultura de sangue, meios líquidos para aeróbios (ou para anaeróbios). A **detecção do crescimento bacteriano é efectuada automaticamente** (medição do CO₂ produzido e modificações do pH).

Critérios de Avaliação de um Sistema Automático

1. Incubação no aparelho à temperatura de 35°C com ou sem agitação contínua
2. Tempo de incubação programável pelo utilizador
3. Avaliação de falsos positivos
4. Avaliação de falsos negativos

Nota: *Nalguns sistemas (equipamentos), é aconselhada a realização de subculturas sempre que haja suspeita de microrganismo de crescimento lento (p. ex. Brucella) ou suspeita de infecção por fungos.*

5. Processamento laboratorial das HEMOCULTURAS POSITIVAS

5.1. Método MANUAL

- **Exame macroscópico** – observação visual diária do crescimento microbiano e subcultura da hemocultura em meio sólido, geralmente **gelose sangue** quando apresenta turvação, hemólise, formação de gás, formação de película ou colónias visíveis na transição entre o sedimento eritrocitário e o meio de cultura.
- Em alternativa, fazer passagens cegas às 24 horas, 48 horas e 7 dias de incubação (método actualmente o menos recomendado).
- Efectuar **subculturas** dos frascos que não apresentem crescimento visível às 72 h:
 - **Gelose sangue e gelose chocolate** com incubação em 5% CO₂ a 35°C até às 48 h.
 - Não é recomendada subcultura em anaerobiose.
 - Subculturas ao 7^o dia consideram-se de pouca utilidade clínica.

5.2. Método AUTOMÁTICO

- Quando o equipamento detecta positividade, realizar subcultura em meio sólido, geralmente em gelose com sangue.
- Possibilidade de efectuar esfregaço da hemocultura com suspeita de positividade e corar pelo método de Gram (observação microscópica).
- Possibilidade de realização de subculturas em diferentes meios e atmosferas de incubação de acordo com a informação obtida pelo exame microscópico, quando realizado.
- Incubação em atmosfera de aerobiose, com 5% CO₂ ou em anaerobiose a 35°C durante 24h a 48h, consoante o microrganismo a pesquisar.
- Leitura macroscópica das culturas e realização da identificação e testes de sensibilidade segundo metodologia existente no laboratório.

6. PROCESSAMENTO DE HEMOCULTURAS QUE REQUEREM TRATAMENTO ESPECÍFICO

6.1. Culturas de sangue para detecção de *Brucella* spp.

Toda a manipulação das culturas para detecção deste agente tem de obrigatoriamente ser efectuada em câmara de fluxo laminar.

- Devem ser utilizados preferencialmente os **meios Bifásicos** ou **sistema de Lise centrifugação**.
- Incubar o meio em estufa com 10% de CO₂ à temperatura de 37°C.
- Se for utilizado um meio bifásico, deve-se proceder ao arejamento do frasco, que deve ser invertido diariamente e observar a presença de crescimento bacteriano.
- Se utilizado meio líquido manual ou sistema automático, devem ser efectuadas subculturas semanalmente, durante 4 semanas para **Gelose sangue Brucella**, **Gelose sangue BHI**, **triptose simples** ou outro específico para a pesquisa deste agente.
- Em culturas positivas proceder à realização de esfregaço da cultura, corar pelo Gram e proceder à identificação.

6.2. Cultura para detecção de *Leptospira*

- A *Leptospira* requer meios específicos para o seu crescimento, como o **meio de Fletcher** com adição de soro de coelho a 14% (vol./vol.) ou meio de *Leptospira* com albumina e ácido gordo. Estes meios devem estar contidos em tubos de 5 ml.
- Inocular 6 tubos do meio a usar
 - Em 2 tubos adicionar uma gota de sangue
 - Em 2 tubos adicionar 2 gotas de sangue
 - Em 2 tubos adicionar 1 gota de sangue previamente diluído 1:10 em tampão salino de fosfato estéril.

- Incubar os tubos no escuro entre 28° C e 30°C durante 6 semanas.
- Semanalmente remover uma gota do meio 1 a 3 cm abaixo da superfície e examinar em microscópio de fundo escuro.

6.3. Neutralização ou Inativação dos Agentes Antimicrobianos

Nos doentes que recebem altas doses de β -lactâmicos, podem ser usados os seguintes procedimentos:

- 1. Frascos com resinas para remoção dos agentes antimicrobianos**
- 2. Adição de penicilinase** - aspticamente adicionar a penicilinase nas proporções recomendadas pelo fabricante.
(Realizar o teste de esterilidade da penicilinase, inoculando 3 a 5 gotas em TSB e incubar durante 5 dias).

LÍQUIDO CÉFALO - RAQUIDIANO

1. INTRODUÇÃO

A Meningite Bacteriana é uma Emergência Médica pois a infecção das meninges é uma situação clínica grave e potencialmente mortal se não tratada atempadamente.

O **diagnóstico laboratorial é uma urgência** que requer processamento imediato do produto para determinar o agente etiológico. Geralmente são as **bactérias aeróbias** que causam esta infecção, mas na presença de abscesso cerebral o agente etiológico pode ser uma bactéria anaeróbia.

Agentes Etiológicos das Meningites Agudas

Idade ou Condição	Microrganismos
Recém-nascido	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , Herpes simplex virus 2
< 2 meses	<i>S. agalactiae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>
< 10 anos	Virus, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>
Adultos Jovens	Virus, <i>N. meningitidis</i>
Adultos	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>
Idosos	<i>S. pneumoniae</i> , Bacilos Gram negativo, <i>L. monocytogenes</i>
Doentes Imunodeprimidos	<i>Cryptococcus neoformans</i>

2. AMOSTRAS

- A colheita deve ser feita antes do início da terapêutica antimicrobiana.
- A colheita é feita por **punção lombar** e o LCR deve ser colhido em tubos inquebráveis, transparentes, com tampa de rosca e fundo cônico para concentração do produto, uma vez que pode conter muito poucas bactérias.
- Deve ser enviado ao Laboratório **imediatamente após a colheita, e mantido à temperatura ambiente (ou na estufa a 35°C) e nunca refrigerado antes do processamento**, a não ser que sejam pedidos estudos virais. Apenas o LCR para estudos virais deve ser refrigerado ou congelado.
- São necessários 3 tubos: 2 para exame citológico e bioquímico e outro para **exame microbiológico (último tubo)**.

- São necessários pelo menos os seguintes **volumes mínimos**:
 - 1 ml para a cultura bacteriana
 - 2 ml para a cultura de fungos
 - 3 ml para a cultura de micobactérias
- A observação de esfregaço corado pelo método de Gram é importante, e **qualquer resultado positivo deve ser comunicado imediatamente ao clínico**.

3. MEIOS de CULTURA e REAGENTES

- **Gelose chocolate com suplemento polivitamínico**
- **Gelose sangue**
- **Caldo cérebro-coração (BHI)**, ou **meio de Tioglicolato** na suspeita de anaeróbios.

4. PROCESSAMENTO LABORATORIAL

- Avaliar o volume da amostra de LCR e descrever a sua aparência microscópica.
- Se o volume for superior a 1 ml **centrifugar durante 20 minutos (1.500 a 3.000 g)**, se for inferior utilizar só o agitador para homogeneizar a amostra.
- Aspirar o sobrenadante com uma pipeta esterilizada, deixando aproximadamente 0,5 a 1 ml de sedimento e guardar aquele para estudos adicionais, durante uma semana.
- Ressuspender o sedimento **agitando vigorosamente durante 30 segundos**.
- Preparar o **esfregaço** colocando uma ou duas gotas sem espalhar do sedimento numa lâmina de vidro nova limpa com álcool e seca. Fixar com metanol e corar pelo método de GRAM e AZUL de METILENO. A citocentrífuga é um método alternativo para a preparação do esfregaço.
- Com uma pipeta esterilizada, inocular os meios a partir do sedimento incubar a 35°C em **atmosfera de 5 % CO₂** até às 72 horas, observando as placas diariamente.
- Fazer a passagem dos meios líquidos de enriquecimento às 24 e/ou 48 horas
- **Antigénios capsulares bacterianos**

Pode ser feita pesquisa de antigénios bacterianos (*Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*) sempre que clinicamente se justifique, nunca dispensando a sua correlação com o exame bacteriológico directo e cultural. Seguir as instruções do fabricante. Um resultado positivo depende do nível de antigénios detectáveis e não substitui a CULTURA.

A sensibilidade dos testes de látex é variável, e cada laboratório deve avaliar a sensibilidade e especificidade para o método utilizado.

LÍQUIDOS de SEROSAS (ORGÂNICOS)

1. INTRODUÇÃO

Os líquidos orgânicos são normalmente estéreis e qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado.

2. AMOSTRAS

- Líquido pleural
- Líquido peritoneal
- Líquido pericárdico
- Líquido sinovial

3. COLHEITA E TRANSPORTE

- A colheita depende do local anatómico, mas deve seguir-se sempre uma **técnica asséptica**.
- Para o estudo bacteriano é recomendado um volume mínimo de amostra de 1 ml. Para a pesquisa de micobactérias ou fungos é necessário, quando possível, um volume superior (10 a 20 ml).
- Colher para **recipiente esterilizado seco com tampa de rosca**.
- Para pesquisa de anaeróbios, utilizar meio de transporte próprio.
- Enviar de imediato ao laboratório.
- Adicionalmente, quando indicado e protocolado com o laboratório, podem fazer-se colheitas com inoculação em **frasco para Hemocultura**, o que não dispensa o envio de produto para exame directo ou outros estudos laboratoriais.

4. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

- **Gelose sangue**
- **Meio selectivo para bactérias Gram negativo**
- **Meio líquido de enriquecimento** (por ex. BHI ou thioglicolato)
- Quando indicado, utilizar outros meios para pesquisa de outros microrganismos (ex.: gelose chocolate no líquido sinovial)

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Processamento inicial da amostra

- Observar / Descrever o aspecto macroscópico da amostra
- Os **líquidos límpidos** devem ser **concentrados** por centrifugação, enquanto as amostras purulentas podem ser inoculadas directamente nos meios de cultura:
 - Centrifugar durante 15 a 30 minutos a 1500 g.
 - Aspirar o sobrenadante com uma pipeta esterilizada, deixando cerca de 1 ml de líquido no qual se ressuspende o sedimento.
- Os líquidos que apresentem coágulos devem ser homogeneizados.

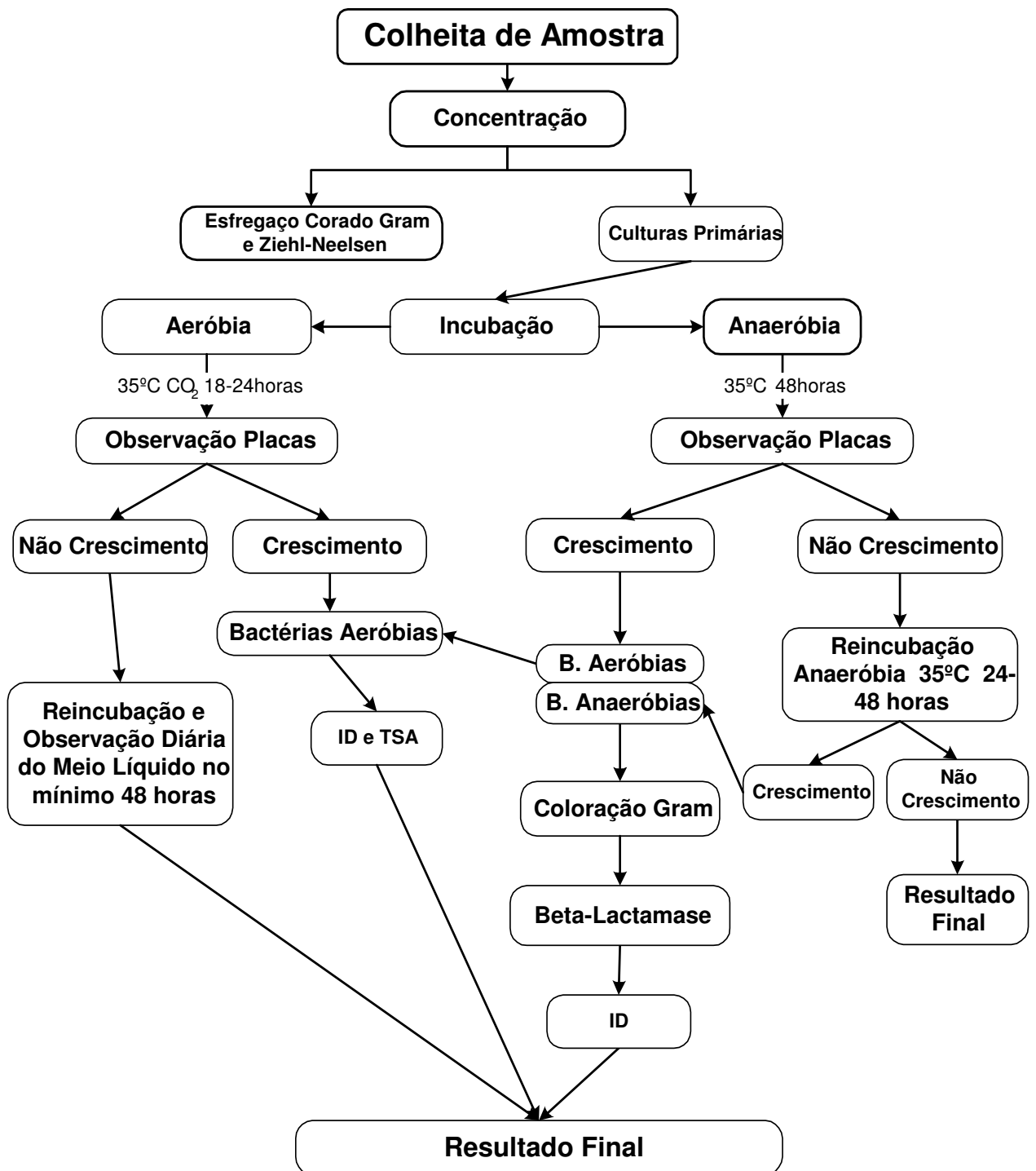
5.2. Exame DIRECTO

- Preparar um esfregaço do sedimento e corar pelo GRAM.

5.3. Exame CULTURAL

- Com uma pipeta esterilizada transferir 2 gotas do sedimento para cada placa dos meios de cultura e semear com ansa esterilizada.
- Incubar as placas de gelose sangue e gelose chocolate em atmosfera de 5% de CO₂ a 35°C, durante 18 a 24 horas.
- Incubar o meio selectivo para Gram negativo e os meios líquidos a 35°C, em aerobiose.
- Fazer a passagem dos meios líquidos de acordo com o diagnóstico, exame directo e a cultura primária.

Fluxograma do exame bacteriológico dos Líquidos de Serosas



APARELHO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

1. INTRODUÇÃO

As infecções das vias respiratórias superiores são muito frequentes, sendo a maior parte de etiologia viral. O diagnóstico bacteriológico dessas situações representa uma tentativa de identificar, entre uma flora indígena abundante, o(s) agente(s) implicado(s) na infecção.

Flora microbiana indígena do aparelho respiratório superior

Existe uma flora mista abundante, constituída por aeróbios e anaeróbios. Vários agentes patogénicos tais como o *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriaceae*, podem constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis. Nos seios paranasais e ouvido médio não há flora microbiana nos indivíduos saudáveis.

2. FARINGITE

A principal causa de faringite é viral. Na faringite bacteriana a principal causa é o ***Streptococcus* β-hemolítico do grupo A**. Outras causas de faringite são a *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*, devendo a pesquisa destes agentes ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do médico.

2.1. **Faringite ESTREPTOCÓCICA**

- **Agente patogénico** - *Streptococcus pyogenes* (**S. β-hemolítico do grupo A**)
- **Colheita e Transporte**
 - Deprimir a língua com uma espátula e utilizar uma zaragatoa de algodão, alginato de cálcio ou dacron. Colher a amostra passando vigorosamente a zaragatoa ao nível das amígdalas e porção posterior da faringe, evitando tocar a língua e a úvula.
 - Não é necessário a utilização de meio de transporte se o processamento laboratorial ocorrer dentro de 3 horas após a colheita. Noutras situações, deve ser utilizado meio de Stuart ou Amies.
- **Exame DIRECTO**

Não se recomenda no diagnóstico da faringite estreptocócica, devido à existência de uma flora mista e de um grande número de outros *Streptococcus* na orofaringe, sendo por isso difícil a sua interpretação.

- **Exame CULTURAL**

- **Gelose sangue**
- **Meio de Todd-Hewitt suplementado com sangue** – a subcultura às 24 horas pode facilitar a detecção do *Streptococcus* β hemolítico do grupo A quando ele se encontra presente em pequeno número.

Incubar o meio durante 18-24 h a 35° C em atmosfera de aerobiose (eventualmente em anaerobiose que favorece a hemólise uma vez que a Streptolisina O é oxigénio-lábil).

2.2. **Faringite GONOCÓCICA**

- **Agente patogénico** - *Neisseria gonorrhoeae*

- **Colheita e Transporte**

A nível das amígdalas e faringe posterior com colocação em meio de transporte com carvão (ex.: Meio de Amies com carvão).

- **Exame DIRECTO** - não deve ser efectuado, devido à existência de neisserias saprófitas que fazem parte da flora faríngea.

- **Exame CULTURAL**

- **Meio selectivo para *N. gonorrhoeae*** (meio GC, Thayer-Martin modificado ou New York City)
- Incubação durante 48-72 horas a 35°C em atmosfera de 5-10% de CO₂ .

2.3. **Faringite na TOSSE CONVULSA**

- **Agente patogénico** - *Bordetella pertussis*

- **Colheita e Transporte**

- Com zaragatoa flexível de alginato de cálcio, colher muco da nasofaringe por via nasal ou efectuar colheita por aspiração nasofaríngea.
- O agente é muito sensível à desidratação, devendo a amostra ser semeada à cabeceira do doente e imediatamente enviada ao Laboratório. Se isso não for possível, utilizar meio de transporte e de enriquecimento que contém na sua constituição, cefalexina, sangue desfibrinado de cavalo e agar semi - sólido.

- **Exame CULTURAL**

Em **meio de Bordet-Gengou** ou outro meio selectivo, com incubação a 35°C em atmosfera húmida durante 5-7 dias em aerobiose.

2.4. Faringite DIFTÉRICA

- Agente patogénico - *Corynebacterium diphtheriae*

- Colheita e Transporte

Colher exsudado a nível da orofaringe e da nasofaringe com zaragatoa. Se não for processado imediatamente, colocar em meio de transporte.

- Exame CULTURAL

- Semear em **meio de Loeffler** e incubar 18 horas em aerobiose a 35°C.
- **Diagnóstico presuntivo** – da cultura, realizar esfregaço e corar com azul de metileno para observação da presença de bacilos em “paliçada” ou “caracteres chineses” apresentando grânulos metacromáticos.
- **Diagnóstico definitivo** – ver capítulo respectivo.
- Se as culturas forem positivas, é necessário para a confirmação clínica de difteria, a pesquisa da toxina (Teste de Elek – verificar que se trata de estirpe toxigénica).

2.5. Angina de VINCENT

- É um tipo de infecção da faringe devido a dois anaeróbios - *Borrelia vincentii* e *Fusobacterium spp.*
- O diagnóstico laboratorial é feito por **exame directo do esfregaço** de material da faringe colhido com zaragatoa e corado com carbolfucsina diluída (fucsina de Ziehl diluída a 1:10).
- A observação de muitas espiroquetas e bacilos fusiformes com muitos polimorfonucleares confirma o diagnóstico.

3. LARINGITE

Quase sempre de etiologia viral, o exame bacteriológico não está indicado nestas situações, excepto para a exclusão da difteria ou infecção por *Streptococcus β-hemolítico do grupo A*.

4. EPIGLOTITE

- Geralmente de etiologia bacteriana, sendo na sua maioria provocada pelo *Haemophilus influenzae* tipo B.
- O **diagnóstico é essencialmente clínico** e através de **hemoculturas** (positivas em cerca de 50% dos casos). Está contra-indicada a colheita de amostras da epiglote devido ao risco de poder originar uma obstrução aguda das vias aéreas .

5. SINUSITE

Frequentemente de origem endógena, a partir de microrganismos presentes nas vias aéreas superiores .

Agentes mais frequentes

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus* spp
- *Staphylococcus aureus*
- Bacilos Gram negativo
- Eventualmente, Anaeróbios

• Colheita e Transporte

Realizada pelo especialista, a **ÚNICA amostra válida** para exame bacteriológico é a obtida por punção do seio perinasal, com envio ao Laboratório em meio de transporte para aeróbios e eventualmente para anaeróbios.

• Exame DIRECTO

Fazer esfregaço para coloração pelo GRAM.

• Exame CULTURAL

Meios sólidos

- **Gelose sangue**
- **Gelose chocolate**

Meios líquidos

- **BHI ou Todd-Hewitt**, suplementado com sangue
- **Meio de carne cozida** (para pesquisa de anaeróbios)

- Incubação durante 18 a 24 h em atmosfera de 5% de CO₂.
- Sub-cultura dos meios líquidos para meios sólidos de acordo com culturas iniciais.
- Quando indicado processar para pesquisa de anaeróbios.

6. OTITE MÉDIA

A otite média é uma infecção muito frequente em bebês e crianças

Agentes mais frequentes

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Haemophilus influenzae*

Como agentes menos frequentes - *S. aureus* , *M. catarrhalis*, *Enterobacteriaceae* e anaeróbios

- **Colheita e Transporte**

A melhor amostra é a colhida por **timpanocentese** com transporte ao Laboratório em meio de transporte para aeróbios e para anaeróbios. Se tiver havido ruptura do tímpano, utilizar um espéculo auricular e colher o exsudado com zaragatoa. Enviar em meio de transporte para aeróbios.

- **Exame DIRECTO** - fazer esfregaço para coloração pelo GRAM .
- **Exame CULTURAL** - proceder como em 5.

7. OTITE EXTERNA

Não é uma infecção das vias respiratórias superiores mas é importante fazer a distinção entre as zaragatoas auriculares para colheita de pus com origem no ouvido médio por ruptura do tímpano, e as zaragatoas para diagnóstico de infecções bacterianas da pele do canal auditivo externo, sendo a ***Pseudomonas aeruginosa*** uma causa frequente de otite externa .

8. COLHEITA DE AMOSTRAS COM FINS EPIDEMIOLÓGICOS

A colheita de amostras das vias respiratórias superiores ocorre por vezes com a finalidade de se fazer a detecção de portadores de *S. aureus* e de *N. meningitidis*.

- **Despiste de portadores na nasofaringe de *S. aureus*** - para vigilância e controlo de surtos de infecção nosocomial.

Colheita da amostra - colher com zaragatoa a nível das narinas e faringe e semear em **meio selectivo (manitol salgado)**. Incubar em aerobiose a 35°C durante 18-24h.

- **Despiste de portadores de *N. meningitidis*** - para controlo de disseminação da infecção a partir de um caso de doença meningocócica.

Colheita da amostra - a partir da orofaringe e nasofaringe com colocação em meio de transporte apropriado. Efectuar a sementeira das zaragatoas em **meio selectivo** (Thayer-Martin modificado ou New York City ou VCAT) e incubar durante 48-72h a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂.

APARELHO RESPIRATÓRIO INFERIOR

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico das infecções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório deve processar apenas as **amostras de boa qualidade**.

2. AMOSTRAS

- **Expectoração**
- **Secreções brônquicas** (aspiração endotraqueal)
- **Lavado brônquico**
- **Lavado bronco-alveolar**
- **Escovado brônquico**
- **Biópsia brônquica**
- **Aspirado transtraqueal**
- **Aspirado pulmonar** (transtorácico)
- **Biópsia pulmonar** (toracotomia)

3. COLHEITA e TRANSPORTE

3.1. Expectoração

- Se possível, colher a primeira expectoração da manhã.
- Lavar a boca e gargarejar só com água antes da colheita.
- Instruir o doente para colher expectoração por tosse profunda (desprezar amostras de saliva ou rinorreia posterior).
- Colocar a amostra em recipiente estéril, seco, de boca larga e tampa de rosca.

3.2. Expectoração Induzida

- Se a expectoração for escassa, proceder à indução da mesma por nebulização com soro fisiológico (20 a 30 ml de uma solução de 3 a 10% de NaCl 0,85% em H₂O).
- A indução da expectoração também pode ser feita por cinesiterapia respiratória.
- Restantes procedimentos idênticos aos da expectoração.

Nota: este procedimento não é recomendado em caso de suspeita de tuberculose.

3.3. Secreções brônquicas por Aspiração Endotraqueal

- Aspirar as secreções e colocar em recipiente seco, estéril com tampa de rosca ou tubo de Luken.

3.4. Amostras colhidas por Broncoscopia

3.4.1. Lavado brônquico ou Lavado bronco-alveolar

- Enviar as amostras ao laboratório em recipientes secos, estéreis, com tampa de rosca devidamente marcados por ordem de colheita (1^o, 2^o e 3^o).

3.4.2. Escovado brônquico

- Colocar o “escovado” em recipiente esterilizado com 1ml de água destilada esterilizada ou 1ml de Lactato de Ringer.

3.4.3. Biópsia brônquica e pulmonar transbrônquica

- Colocar em recipiente esterilizado com uma pequena quantidade de água esterilizada .

3.5. Aspirado transtraqueal

- Desinfecção correcta da pele no local de punção
- Anestesia local e colheita por aspiração
- Colocar a amostra em recipiente esterilizado ou em meio de transporte apropriado se pretendida cultura para anaeróbios

3.6. Aspirado pulmonar (transtorácico)

- Colheita cirúrgica controlada por TAC
- Se a lesão for de grandes dimensões ou múltipla, colher várias amostras.
- Enviar ao laboratório a amostra na seringa devidamente tapada por borracha esterilizada.

3.7. Biópsia pulmonar (toracotomia)

- Se possível colher 1 a 3 mm³ de tecido pulmonar.
- Se a lesão for de grandes dimensões ou múltipla, colher várias amostras.
- Colocar em recipiente seco e esterilizado
- As amostras devem ser enviadas ao laboratório no **prazo máximo de 30 minutos**.

4. MEIOS de CULTURA e REAGENTES

- **Gelose sangue**
- **Gelose chocolate selectiva para *Haemophilus* spp.**
- **Meio de MacConkey** (opcional)
- Meios para anaeróbios, quando indicado

5. PROCEDIMENTOS

5.1. EXPECTORAÇÃO e SECREÇÕES BRÔNQUICAS

Exame DIRECTO

- Seleccionar uma porção purulenta da amostra, efectuar um esfregaço por estiramento e corar pelo método de Gram.
- Observar ao microscópio óptico com objectiva 10 x (cerca de 10 campos) para **avaliar a qualidade da amostra** tendo em conta a presença de células epiteliais pavimentosas (da orofaringe) e leucócitos.
- Classificar as amostras segundo o critério de Murray e Washington ou equivalente.

Tabela de Murray e Washington

	Células epiteliais / Pequena ampliação (10 X)	Leucócitos / Pequena ampliação (10 X)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	< 10	25

- Segundo este critério, processar as amostras que se englobem nos **grupos 4 e 5**. São as de boa qualidade para o exame bacteriológico habitual.
- Não deverá ser aplicado este critério em doentes neutropénicos e na pesquisa de outros agentes específicos, tais como *Mycobacterium* sp, *Legionella* sp, *Mycoplasma* sp, etc. (agentes que não fazem parte da flora normal da orofaringe e não a colonizam).

Exame CULTURAL

- De porção purulenta seleccionada, semear com ansa esterilizada segundo o método dos quatro quadrantes, nos seguintes meios de cultura:
 - **Gelose sangue**
 - **Gelose chocolate selectiva para *Haemophilus* spp.**
 - **MacConkey** (opcional)
- Incubar em atmosfera de 5 % de CO₂ a 35° C durante 18 a 24 horas.
- Valorizar as culturas de acordo com a observação do Gram e informação clínica.
- Reisolat e identificar a estirpe valorizada.

5.2. ESCOVADO BRÔNQUICO

Exame CULTURAL

- Agitar no “vortex” o tubo que contém o escovado e o líquido de transporte.
- Semear com ansa calibrada ou com pipeta 10 µl nos meios de cultura:
 - **Gelose sangue**
 - **Gelose chocolate selectiva para *Haemophilus* spp.**
 - **MacConkey** (opcional)
- Incubar em atmosfera de 5 % de CO₂ a 35° C durante 18 a 24 horas.
- Quantificar o crescimento correspondendo cada colónia a 10² U.F.C./ml.

1 Col =	10 ² U.F.C./ml
10 Col =	10 ³ U.F.C./ml
100 Col =	10 ⁴ U.F.C./ml

- Valorizar as estirpes isoladas em **quantidade >10³**

O volume de secreções colhidas pelo escovado é aproximadamente de 0,001 ml e diluído em 1 ml de líquido de transporte, resulta numa diluição final de 1/1000; assim, um crescimento > 10³ U.F.C./ml indica uma concentração de bactérias de 10⁶ U.F.C./ml nas secreções, valor normalmente considerado significativo de infecção.

- Reisolar e identificar as estirpes valorizadas.

5.3. LAVADO BRONCO-ALVEOLAR

- O lavado broncoalveolar é obtido por instilação e aspiração de uma solução não bacteriostática de NaCl 0,85% através do broncoscópio encravado num segmento brônquico.
- A quantidade de soluto instilado não está padronizada, mas considera-se que pelo menos 120 ml são necessários para obter uma boa amostragem das secreções alveolares.
- A primeira amostra (fracção brônquica) deve ser processada separadamente para coloração e culturas de determinados microrganismos (Micobactérias, *Legionella* e Fungos).
- As outras duas amostras podem ser misturadas e usadas para exame microscópico e culturas quantitativas.
- O **volume mínimo aceitável** para exame directo e cultural é de **5 ml** para cada.

Exame DIRECTO

- **Contagem celular**

- Contagem de células na amostra não fraccionada nem centrifugada, usando um hematocitómetro.
- Devem fazer-se duas contagens e a média das duas será registada como o número de células/ml de LBA (excluem-se os eritrócitos).

- Os esfregaços devem ser efectuados após **citocentrifugação do LBA** (600 a 1000 rpm durante 10 a 20 minutos). Se não existir citocentrífuga poderão ser realizados a partir de um sedimento obtido em centrífuga normal.

- **Coloração GIEMSA**

- Contagem diferencial de leucócitos
- Células epiteliais pavimentosas (>1%, sugere contaminação com flora da orofaringe).
- Observação da existência de células epiteliais brônquicas

- **Coloração de GRAM**

- Semiquantificação e caracterização morfológica e tintorial dos microrganismos presentes.
- Referir a % de neutrófilos com microrganismos intracelulares (ICO).

- **Pesquisa de fibras de Elastina**

- Uma gota de LBA + uma gota KONA 40%.
- Incubar à temperatura ambiente durante 1 a 4 horas ou aquecer à chama.
- Observação microscópica com objectiva 100 x.

Exame CULTURAL

- Agitar no “vortex” durante 30 a 60 segundos e semear com ansa 10 µl nos meios de cultura:

- **Gelose sangue**
- **Gelose chocolate selectiva para *Haemophilus spp.***
- **MacConkey** (opcional)

- Incubar em atmosfera de 5 % de CO₂ em estufa a 35° C durante 24 horas.

- Se ocorrer crescimento quantificar as colónias segundo o seguinte quadro:

1 Col =	10 ² U.F.C./ml
10 Col =	10 ³ .F.C./ml
100 Col =	10 ⁴ .F.C./ml

- Valorizar os microrganismos isolados em quantidade > 10⁴ U.F.C./ml.

O líquido de retorno corresponde a uma diluição de 1/100 do fluído de revestimento alveolar: um crescimento > 10⁴ U.F.C./ml indica uma concentração de bactérias > 10⁶ U.F.C./ml no fluído de revestimento alveolar, valor normalmente considerado significativo de infecção.

- **Em doentes não ventilados, 10⁴ a 10⁵ U.F.C./ml é um valor apropriado para diferenciar colonização de infecção.**
- Em doentes ventilados e sob antibioticoterapia prévia estes valores são imprecisos.

5.4. ASPIRADO TRANSTRAQUEAL, PULMONAR e BIÓPSIA PULMONAR

Exame DIRECTO

- **Aspirado transtraqueal** - efectuar esfregaço de modo idêntico à expectoração ou secreções brônquicas.
- **Aspirado pulmonar** - efectuar um esfregaço fino.
- **Biópsia pulmonar** - esfregaço efectuado directamente por “touchpress” ou a partir de homogeneizado.

Exame CULTURAL

- **Aspirado transtraqueal** - idêntico ao da expectoração e secreções brônquicas.
- **Aspirado pulmonar** - semear directamente nos meios de cultura.
- **Biópsia pulmonar** - cultura do homogeneizado efectuado por maceração.
- Meios de cultura:
 - **Gelose sangue**
 - **Gelose chocolate selectiva para *Haemophilus spp.***
 - **MacConkey** (opcional)
 - **Meio líquido para anaeróbios** (quando solicitada cultura para anaeróbios e se a amostra tiver sido colhida e transportada em condições adequadas).
- Incubar as placas em atmosfera 5 % de CO₂ em estufa de 35° C durante 24 horas.
- Identificar todos os microrganismos isolados.
- Incubar o meio líquido para anaeróbios a 35° C e observar diariamente durante 5 dias. Quando apresentar turvação efectuar um esfregaço do mesmo e corar pelo Gram. Subcultivar em meios sólidos para aeróbios e anaeróbios.
- Identificar todos os microrganismos isolados.

EXSUDADOS OCULARES

1. INTRODUÇÃO

As infecções oculares podem ser divididas em :

- **Infecções das estruturas externas do olho**
 - blefarites
 - conjuntivites
 - queratites

- **Infecções das estruturas internas do olho**
 - endoftalmites

- **Infecções do sistema lacrimal**
 - canaliculites
 - dacriocistites
 - dacrioadenites

A nível do saco conjuntival existe uma **flora saprófita** constituída principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*. Mais raramente podem ser encontrados o *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis* e fungos.

2. COLHEITA E TRANSPORTE

As indicações e técnicas para investigação bacteriológica são determinadas pela localização da infecção (ocular ou peri-ocular), sua gravidade e rapidez de instalação e pelo conhecimento dos principais agentes implicados.

MATERIAL DE COLHEITA

1. **Espátula de platina de Kimura** - para a obtenção de amostras da conjuntiva e da córnea.
2. **Lâminas e agulhas** descartáveis.
3. **Zaragatoas de algodão ou de alginato de cálcio**, com ou sem meio de transporte, de acordo com o tipo de exame que se pretende realizar.
4. **Solução anestésica**.

3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Devido à constante acção de lavagem das lágrimas, o número de bactérias isoladas de algumas infecções oculares é geralmente baixo, pelo que se recomenda a utilização de um grande inóculo e a sementeira em vários meios de cultura. Habitualmente, semeia-se um **meio líquido** (TSB ou BHI) e **meios sólidos** (gelose-sangue, gelose-chocolate). Aos meios referidos poder-se-ão associar outros, de acordo com a suspeita clínica.

3.1. BLEFARITE

Infecção aguda ou crónica da margem da pálpebra envolvendo a pele e pestanas.

- **Principais agentes**

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*

- **Colheita da amostra**

Molhar uma zaragatoa de algodão ou de alginato de cálcio em soro fisiológico esterilizado e passá-la ao longo das margens superior e inferior da pálpebra. Com outra zaragatoa, repetir o mesmo procedimento para o outro olho.

- **Exame DIRECTO** - não é útil, pelo que não deve ser efectuado.

- **Exame CULTURAL**

- Gelose sangue
- **Gelose chocolate selectiva para *Haemophilus* spp.**
- **Meio para fungos** (nas blefarites crónicas)
- Incubação em 5 % CO₂ até às 48 horas

3.2. CONJUNTIVITE

A conjuntivite bacteriana representa o **tipo mais frequente de infecção ocular** e pode ocorrer por inoculação directa ou exógena, ou por disseminação hematogénica a partir dum foco infeccioso.

- **Principais agentes de conjuntivite da comunidade**

- *Staphylococcus aureus*
- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Moraxella catarrhalis*

- **Principais agentes de conjuntivite no recém – nascido**

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Staphylococcus aureus*
- Bacilos Gram negativo

- **Principais agentes em doentes imunocomprometidos**

- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas aeruginosa*

- **Colheita da amostra**

- **Com zaragatoa** - Deve ser feita **antes da aplicação de um anestésico tópico ou antimicrobiano**, pois estes agentes podem interferir no isolamento das bactérias. Utilizar uma zaragatoa de alginato de cálcio e passá-la ao longo da conjuntiva tarsal inferior. Colher amostras de ambos os olhos .
- **Com espátula de Kimura.**

Nota: na suspeita de infecção por *Chlamydia trachomatis*, efectuar colheita para técnica de imunofluorescência directa, de acordo com as instruções do fabricante.

- **Exame DIRECTO**

Quando efectuado realizar o esfregaço na altura da colheita e corar pelo método de Gram.

- **Exame CULTURAL** - semear a amostra nos seguintes meios :

Meios sólidos

- **Gelose-sangue**
- **Gelose-chocolate selectiva para *Haemophilus* spp.**
- **Meio selectivo para *N. gonorrhoeae*** - no recém nascido

Meio líquido

- **BHI** ou outro - facultativo

3.3. QUERATITE

Infecção da córnea que pode apresentar variadas etiologias. As bactérias são responsáveis por 65 - 90% dos casos. Deverá ser encarada como uma situação de emergência porque a perda do olho afectado pode ocorrer em 24h quando bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* ou o *Staphylococcus aureus* estão envolvidas.

- **Principais agentes de infecção**

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Haemophilus* spp
- *Acanthamoeba* spp.

- **Colheita da amostra**

a. Com zaragatoa de alginato de cálcio - o risco de contaminação com a flora indígena é maior.

b. Com espátula de Kimura - são efectuadas pelo oftalmologista várias raspagens, sendo cada uma utilizada para inocular um único meio de cultura e realização de esfregaço para exame directo.

c. Biópsia da córnea - método de colheita utilizado pelo oftalmologista quando não existe supuração da córnea. O tecido córneo é transportado ao Laboratório em meio líquido estéril ou soro fisiológico estéril. Após a biópsia, pode ser obtido material adicional por raspagem da base da mesma.

- **Exame DIRECTO**

Se possível devem ser feitos esfregaços para coloração de Gram a partir do material colhido pelos diferentes métodos, sendo o Gram feito a partir da suspensão ou após esmagamento do tecido córneo.

- **Exame CULTURAL** - a amostra colhida deve ser semeada em:

Meios sólidos

- **Gelose sangue**
- **Gelose chocolate**
- Outros, de acordo com a suspeita clínica

Meio líquido

- **BHI ou Todd-Hewitt**

- Os pequenos fragmentos de biópsia podem ser semeados directamente em meio líquido.
- Incubação a 35° C em aerobiose durante 18-24 h.
- Sub-cultura dos meios líquidos de acordo com os agentes isolados nas culturas primárias.

3.4. ENDOFTALMITE

É a mais grave infecção do olho. É uma inflamação da cavidade ocular e tecido intraocular e pode ocorrer por via exógena, endógena ou por contiguidade.

- **Principais agentes de infecção**

Endoftalmites pós cirúrgicas

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus coagulase-negativo*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacteriaceae*

Endoftalmites pós traumáticas

- *Bacillus* spp
- *Clostridium* spp

Endoftalmites endógenas

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Neisseria meningitidis*

- **Colheita da amostra**

- Devido à dificuldade da colheita, o laboratório deve ser previamente contactado
- A colheita é cirúrgica, efectuada pelo oftalmologista.
- As seringas contendo o produto aspirado deverão ser fechadas e enviadas de imediato ao Laboratório de Microbiologia.

- **Exame DIRECTO**

Se o volume da amostra for suficiente, efectuar esfregaço para coloração de Gram.

- **Exame CULTURAL**

Em meios líquidos e sólidos como em **3.3** e efectuar também **cultura em anaerobiose**, quando indicado.

Nota - no diagnóstico das infecções oculares graves como as queratites e endoftalmites, devem ser feitas **hemoculturas**.

3.5. CELULITE ORBITÁRIA

É uma infecção sistémica e grave que envolve o tecido orbitário resultante de trauma, cirurgia, extensão de infecção a partir do etmóide ou seios perinasais ou disseminação hematogénea.

- **Principais agentes de infecção**

Infecção pós cirúrgica

- *Staphylococcus aureus*

Infecção pós trauma - Infecção mista por aeróbios e anaeróbios

Infecção associada a sinusite

- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- Bacilos Gram negativo

- **Colheita da amostra**

- Deve ser feita pelo oftalmologista
- Desinfectar a pele com solução alcoólica iodada.
- Nas lesões fechadas, se possível colher o material purulento com agulha e seringa.
- Se existir ferida cirúrgica ou traumática, limpar a ferida com soro fisiológico esterilizado e colher a amostra com zaragatoa. Enviar a amostra ao Laboratório em meio de transporte para aeróbios.

- **Exame DIRECTO**

Efectuar esfregaço a partir do material colhido para coloração de Gram.

- **Exame CULTURAL**

Efectuar em meios líquidos e sólidos como em 3.3., e também cultura em anaerobiose quando indicado.

3.6. INFECÇÕES do APARELHO LACRIMAL

3.6.1. DACRIOADENITE / DACRIOCISTITE

A dacrioadenite é uma infecção das glândulas lacrimais em que os principais agentes são:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*

A dacriocistite é uma infecção do saco lacrimal, que ocorre habitualmente por obstrução do canal lacrimal. Os principais agentes são :

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Haemophilus influenzae*

- **Colheita da amostra**

Não deve ser efectuada através de punção da glândula lacrimal. Colher exsudado com zaragatoa de algodão ou alginato de cálcio .

- **Exame DIRECTO**

Efectuar esfregaço para coloração de Gram.

- **Exame CULTURAL** – como em 3.3

3.6.2. CANALICULITE

Inflamação do canal lacrimal, frequentemente associada a obstrução do mesmo. A maior parte das infecções são devidas a anaeróbios, embora possam ocorrer infecções mistas por aeróbios e anaeróbios. Os principais agentes são:

- *Actinomyces israelii*
- *Propionibacterium propionicus*
- *Moraxella catarrhalis*
- Difteroides
- *Streptococcus viridans*

- **Colheita da amostra**

Por compressão da pálpebra e canalículos. Grânulos sulfurosos podem ser esmagados numa lâmina para coloração.

- **Exame DIRECTO**

Efectuar esfregaço para coloração de Gram.

- **Exame CULTURAL**

- **Gelose sangue**
- **Gelose-chocolate**
- **Meio para fungos**
- **Meio de carne cozida** ou de **Thioglicolato**

EXSUDADOS PURULENTOS

1. INTRODUÇÃO

- Muitas são as situações clínicas e muitos são os respectivos microrganismos responsáveis por infecções localizadas que conduzem à formação de exsudados purulentos, colectados ou não.
- No Quadro n.º 1 exemplificam-se alguns microrganismos e respectivas potenciais localizações da infecção.
- Assim, devido às múltiplas variáveis envolvidas, a metodologia para o estudo microbiológico de qualquer exsudado purulento tem de ter em consideração:
 1. **Local da infecção**
 2. **História clínica**, nomeadamente dados epidemiológicos.
 3. **Tipo de infecção** (abcedada ou não)
 4. **Modo de colheita**
- Perante a variedade de situações clínicas e de agentes microbianos implicados, os procedimentos que se desenvolvem a seguir dizem respeito à metodologia geralmente aplicada para a maioria das situações. Não se pode excluir portanto a necessidade de métodos específicos quando a situação nosológica indique a probabilidade de se tratar de agente específico, por ex. pesquisa de bactérias anaeróbias, devendo então reportarmo-nos à secção respectiva. A pesquisa de micobactérias ou fungos têm metodologia própria que não está incluída neste manual .

2. COLHEITA e TRANSPORTE das AMOSTRAS

2.1. Normas GERAIS

- Todas as amostras têm de ser identificadas com os **dados demográficos do doente, data e hora da colheita, identificação do produto, local anatómico da colheita** (quando não seja implícito na denominação do produto biológico). Estes dados condicionam a metodologia laboratorial a utilizar.
- Toda a amostra tem de se colocar em **contentor esterilizado**. Eventualmente o produto pode ser enviado ao laboratório na própria seringa com que foi colhido, SEMPRE APÓS RETIRAR A AGULHA e desde que exista forma de fechar a seringa com tampa estéril não perfurante ou cortante.
- O transporte ao laboratório e respectivo processamento deve ser o mais rápido possível, no máximo **até duas horas após a colheita**.
- As amostras que não são transportadas rapidamente ao laboratório, que estejam contaminadas com flora mista da pele, ou ainda que contenham microrganismos de

colonização, conduzem a falsos resultados com o conseqüente diagnóstico clínico e respectiva terapêutica incorrectos.

- Os melhores produtos para o isolamento do agente etiológico são os **exsudados colectados** ou **biópsias tecidulares**.

2.2. Exsudados de lesões fechadas:

- A colheita dos exsudados profundos deve ser realizada por **punção e aspiração com agulha e seringa**. NÃO devem ser usadas zaragatoas para a colheita de amostras provenientes deste tipo de lesões.
- Quando se realiza por punção, a pele deve ser desinfectada com mistura anti-séptica alcoólica (para evitar a contaminação com flora extrínseca ou indígena).

2.3. Exsudados de lesões abertas:

- Quando não há alternativa e se tem de colher com zaragatoa, esta deve ser colocada em meio de transporte (Stuart ou Amies). **NÃO USAR ZARAGATOAS SECAS.**

2.4. Material tecidular / Biópsia

- Colher de forma asséptica uma pequena quantidade de tecido (não superior a cerca de 0,5 cm de diâmetro).
- Lesões abertas - lavar com líquido estéril (água destilada ou soro fisiológico), remover o tecido necrosado e fazer a biópsia das lesões mais profundas e com sinais de infecção.
- Lesões fechadas - realizar de acordo com o procedimento cirúrgico.
- Colocar a amostra num tubo esterilizado seco e enviar imediatamente ao laboratório.
- Estabelecer de acordo com o laboratório, metodologia diferente de colheita e transporte em produtos particulares.

2.5. Exsudado de úlceras de pressão (escaras) ou vasculares (úlceras varicosas)

- Estas amostras têm em si uma grande quantidade de tecidos necrosados o que favorece a colonização com múltiplas estirpes bacterianas, com a conseqüente dificuldade de determinar o agente etiológico.
- Este exame só tem interesse se conduzir a informação clínica relevante no mais curto espaço de tempo.
- O laboratório tem de fornecer normas de colheita com o objectivo de evitar a contaminação com flora indígena da pele.
- Distinguir, na valorização das culturas, microrganismos da pele ou contaminantes, dos agentes potencialmente patogénicos.

- Só realizar a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos agentes isolados em amostras colhidas correctamente e em bactérias consideradas como agentes etiológicos de infecção.
- Sempre que possível fazer colheita de biópsia tecidual, após ter feito a limpeza da ferida como indicado em 2.4.
- Quando não é possível fazer biópsia colher o exsudado superficial com auxílio de zaragatoa, colocar em meio de transporte e enviar rapidamente ao laboratório

3. PROCESSAMENTO LABORATORIAL

3.1. Material colhido por ASPIRAÇÃO

3.1.1. Exame DIRECTO

- Coloração de Gram
- Coloração de Ziehl-Neelsen - eventual
- Coloração simples (azul de metileno) - eventual

3.1.2. Exame CULTURAL

Meios sólidos

- **Gelose sangue**
- **Meio selectivo para bactérias Gram negativo** (ex.: MacConkey)
- **Meio selectivo para bactérias Gram positivo** (ex.: Azido de Sódio, "ANC")
- **Meio selectivo para isolamento de *Staphylococcus sp.*** - eventual
- Outros de acordo com a suspeita clínica (por ex. Meios selectivos para isolamento de *Haemophilus sp.* ou *Neisseria sp.*, etc.)

Meios líquidos (enriquecimento)

- **BHI** ("Brain Heart Infusion") ou **meio Todd-Hewitt** com sangue, ou outro.
 - **Meio de carne cozida**
(seleccionar um ou dois destes meios)
- Incubação a 35 °C, aerobiose, 18-24 horas.
 - Efectuar sub-cultura dos meios líquidos para meios sólidos de acordo com o produto biológico, o tipo morfológico das bactérias observadas no exame directo, e/ou agentes isolados nas culturas iniciais.
 - Se suspeita de anaeróbios, vide secção respectiva do manual.

3.2. Material colhido com ZARAGATOA

- Colocar a zaragatoa em 0,5 ml de caldo (BHI, Triptose ou Todd-Hewitt) e agitar com auxílio de agitador mecânico (vortex).
- Com a suspensão obtida, realizar o procedimento como descrito em 3.1.

3.3. Material TECIDULAR / BIÓPSIA

- Triturar a amostra com auxílio de frasco com pérolas (ou outro método disponível).
- Restante procedimento como em 3.1.

3.4. Exsudado de ÚLCERAS de pressão (escaras) ou vasculares (úlceras varicosas)

- Exame CULTURAL
 - **Gelose sangue**
 - **Meio selectivo para isolamento de bactérias Gram negativo** (ex: MacConkey)
 - **Meio selectivo para isolamento de bactérias Gram positivo**(Azido de Sódio, ANC)
- Restante procedimento como em 3.1.

BIÓPSIAS CIRÚRGICAS
(c/ dimensões que não permitem homogeneização)

MATERIAL PROTÉSICO
(Válvulas cardíacas, fragmentos vasculares e ósseos)

1. Colheita no Bloco Operatório

- Colocar em contentor estéril de boca larga e enviar de imediato ao laboratório.
- No laboratório em condições de assépsia adicionar meio líquido (ex.: BHI).
- Em alternativa - ainda no bloco operatório colocar a biópsia em frasco de boca larga com meio BHI previamente fornecido pelo laboratório. Enviar de imediato para incubação e processamento laboratorial.

2. Processamento

- Incubar 35 °C até 12 dias.
- Observar diariamente a turvação.
- Se sobrenadante turvo, sub-cultivar em **gelose sangue** e realizar um esfregaço da cultura para coloração de Gram.
- Se límpido até ao 12º dia, realizar uma passagem cega para gelose sangue e realizar esfregaço para coloração de Gram.

CATETERES VASCULARES (método de Maki)

O objectivo é avaliar a possibilidade da responsabilidade do catéter como origem de um quadro de bacteriémia.

1. Colheita e Transporte

- Colher, de veia periférica não cateterizada, sangue para hemocultura, imediatamente antes da retirada do cateter
- Retirar o penso e desinfetar com anti-séptico alcoólico a porta de entrada do catéter.
- Colher asépticamente os 5 cm distais do cateter. Colocar num recipiente estéril e seco.

- Enviar imediatamente ao laboratório.

2. Processamento

- Asepticamente remover o catéter e colocá-lo na superfície de uma placa de **gelose sangue**. Rodar o cateter na superfície do meio de cultura com auxílio de uma vareta esterilizada.
- Incubar a 35 °C.
- Se desenvolvimento > 15 colónias valorizar e identificar.
- Correlacionar os isolamentos da cultura do catéter, com o resultado da hemocultura concomitante.

Quadro 1

Lista parcial de agentes bacterianos detectados em infecções da pele e tecido celular subcutâneo:

Microrganismo	Infecção ou Síndrome
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Lesões actinomicóticas
<i>Aeromonas</i> spp.	Feridas
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Abcessos
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Abcessos
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Feridas; Infecções de catéteres
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	Feridas de mordedura de cão
<i>Eikenella corrodens</i>	Infecções de tecidos moles; mordedura humana
<i>Enterobacteriaceae</i>	Feridas; Feridas crónicas e/ou profundas; lesões de queimaduras.
<i>Enterococcus</i> spp.	Feridas; lesões de queimaduras.
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	“Erisipelóide”
<i>Haemophilus influenzae</i>	Lesões cutâneas associadas com infecções sistémicas
<i>Kingella kingae</i>	Infecções ósseas ou de articulações
Flora oral	Feridas de mordeduras
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Lesões cutâneas associadas com infecções sistémicas
<i>Nocardia</i> spp.	Abcessos cutâneos ou sub-cutâneos
<i>Pasteurella multocida</i>	Mordedura de animais; osteomielite.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Feridas; lesões de queimadura; furunculose;
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecções eritematosas superficiais; infecções profundas; abcessos; lesões de queimadura; feridas; furúnculos.
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativo	Catéteres
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grupo A)	Infecções eritematosas superficiais; infecções profundas; abcessos; lesões de queimadura; feridas; furúnculos; necrose muscular.
<i>Streptococcus</i> spp. beta-hemolítico	Feridas
<i>Streptococcus</i> spp. “grupo viridans”	Feridas; catéteres; mordeduras.
<i>Streptococcus moniliformis</i>	Mordedura de animais
<i>Vibrio vulnificus</i>	Feridas; necrose muscular

(Quadro adaptado de Isenberg, H.D. (ed.) 1992. Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, Washington, D.C.)

Interpretação sumária dos resultados:

- **Deve realizar-se a Identificação e Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos em:**

1. Estirpes com grande probabilidade de serem agentes patogénicos, independentemente do número presente: *Streptococcus* beta-hemolítico do Grupo A de Lancefield, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Agentes potencialmente patogénicos com susceptibilidade aos antimicrobianos imprevisível.
3. Microrganismos isolados de doentes com infecções associadas a catéteres e de locais normalmente estéreis.

- **Agentes provavelmente “contaminantes” da pele:** (Geralmente não responsáveis por infecção)

1. *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus viridans*, *Bacillus* spp., difteróides.
2. **Excepção** - microrganismos isolados em cultura pura e observados no exame directo (Coloração de Gram)

- **Não devem ser valorizados clinicamente:**

Quando estão presentes mais do que três espécies microbianas (particularmente da flora intestinal) de locais como abscessos abdominais, líquido peritoneal, área pélvica, abscessos ou fístulas peri-anais, úlceras de decúbito, úlceras vasculares (“varicosas”).

EXAME BACTERIOLÓGICO DAS FEZES

1. INTRODUÇÃO

- As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com grande morbidade em determinados grupos etários (crianças e velhos).
- Os microrganismos responsáveis por esta infecção, têm vindo a alterar-se devido a vários factores tais como o aumento dos movimentos migracionais, maior frequência de viagens intercontinentais, aumento do número de doentes imunodeprimidos e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico cada vez mais sensíveis.
- Os antecedentes epidemiológicos, a existência de factores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia devem orientar na pesquisa do agente etiológico.

2. AMOSTRAS

2.1. COLHEITA

- Devem ser obtidas **até um total de três amostras** de fezes (cerca de 1 a 2 Gramas – tamanho de uma noz), colhidas em dias diferentes. Se possível escolher uma porção com muco, pus ou sangue.
- Para pesquisa de toxina de *Clostridium difficile* só deverão ser enviadas fezes diarreicas.
- **Exsudado rectal** (para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* ou em casos seleccionados para pesquisa de colonização intestinal – ex: *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina)

2.2. TRANSPORTE

- Colocar as fezes em **meio de transporte de Cary Blair** ou **meio de glicerol tamponado salino**.
- Em situações em que não exista disponibilidade de meio de transporte, as amostras devem ser processadas até 2 horas após a sua emissão.
- As zaragoas para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* deverão ser colocadas em meio de transporte com carvão.

Nota - Não processar amostras contaminadas com urina.

3. MEIOS de CULTURA

- **MacConkey**
- **Meios selectivos para *Salmonella* e *Shigella*** - meio SS , meio Hektoen
- **Meio selectivo para *Campylobacter* spp.**
- **Meio selectivo para *Yersinia enterocolitica***
- Caldos de enriquecimento para *Salmonella* e *Shigella* spp. - meio de Selenito F, meio GN e meio de Tetrionato

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Exame CULTURAL

- **Por rotina devem ser pesquisados *Salmonella* spp, *Shigella* spp, e *Campylobacter* spp.**
- Para além das bactérias acima assinaladas, cada laboratório deve determinar as bactérias que pesquisa por rotina de acordo com a situação geográfica e epidemiológica.

Meios de cultura

- a. Meio de MacConkey
 - b. Meio selectivo para *Salmonella* spp e *Shigella* spp – ex.: meio SS, meio de Hektoen.
 - c. Meio selectivo para *Campylobacter* spp
 - d. Meio de enriquecimento para *Salmonella* spp e *Shigella* spp – ex: meio de Selenito F, meio GN e meio de tetrionato.
- Inocular os meios de MacConkey, os meios selectivos para *Salmonella* spp e *Shigella* spp e os meios de enriquecimento em atmosfera de **aerobiose, a 35° C, durante 18 a 24 horas.**
 - Inocular o meio selectivo para *Campylobacter* spp. e incubar em atmosfera de **microaerofilia (5% de O₂, 10% de CO₂, e 85% de N₂), a 42°C, durante 48 a 72 horas.**
 - Após 12 horas de incubação dos meios de enriquecimento, efectuar subculturas para meio de MacConkey e eventualmente para outros meios selectivos.

4.2. PROCEDIMENTOS ESPECIAIS

- *Vibrio* spp
 - São capazes de crescer nos meios de rotina.
 - Meio selectivo **TCBS** (incubar a 35° C, 18 a 24 horas em aerobiose)
 - Agua peptonada alcalina – incubar a 35° C em aerobiose e efectuar subcultura às 6 ou 12 horas para TCBS.

- **Yersinia spp**
 - Meio selectivo **CYN** (Cefsulodina, irgasan, novobiocina)
 - Incubar a 35°C, 18 a 24 horas em aerobiose.

- **Clostridium difficile**
 - Na suspeita de colite pseudomembranosa efectuar pesquisa de toxina A, em fezes diarréicas.

- **Escherichia coli enterohemorrágica – O157- H7**
 - Meio selectivo – MacConkey – Sorbitol
 - Incubar a 35°C, 18 a 24 horas em aerobiose.

5. IDENTIFICAÇÃO

5.1. Identificação de Salmonella ou Shigella spp.

Das colónias não fermentadoras de lactose com ou sem produção de H₂S, efectuar:

- Subcultura para TSI (superfície e profundidade) e Ureia
- Observação do TSI e Ureia no dia seguinte e se padrão compatível com *Salmonella* spp e *Shigella* spp, efectuar **identificação bioquímica** e posterior **identificação serológica**.

Nota: Se o Laboratório não tem possibilidade de efectuar identificação serológica, deverá enviar as estirpes para Laboratório de Referência.

5.2. Identificação de Campylobacter spp.

- Observar as placas às 24 e 48 horas, e das colónias suspeitas efectuar esfregaço e corar com Safranina ou Fucsina durante 1 a 3 minutos, para observação da morfologia bacteriana (pequenos bacilos curvos, em S ou em asa de gaivota).
- Teste da **oxidase**
- Teste do **hipurato**
- **Susceptibilidade ao Ac. nalidíxico** (30 µg) e **cefalotina** (30 µg) – (já estão descritas estirpes resistentes)
ou
- Testes bioquímicos comercializados

5.2. Identificação de *Vibrio* spp.

- Observação da cultura e das colónias suspeitas realizar identificação bioquímica.
- **Enviar estirpes para confirmação serológica em Laboratório de Referência.**

5.3. Identificação de *Yersinia* spp

- Observação da cultura e das colónias suspeitas realizar identificação bioquímica

5.4. Identificação de *E.coli* enterohemorrágica O157:H7

- Do meio MacConkey sorbitol, isolar as colónias não fermentadoras de sorbitol.
- Identificação bioquímica
- Confirmação serológica

5.5. Pesquisa de toxina de *Clostridium difficile*

O teste de referência é a **pesquisa de toxina B** por cultura de tecidos, mas como muitos laboratórios não tem possibilidade de fazer cultura de tecidos existem outros testes alternativos.

- **Teste de aglutinação em látex** - detecta uma proteína não toxina associada ao *Clostridium difficile* e dá resultados falsos positivos com outros *Clostridium*, *Peptoestreptococcus* e *Bacteroides assacariolíticos*.
- **Detecção de Enterotoxina (Toxina A)** - existem diversos métodos comercializados para detectar a toxina nas fezes.

APARELHO GENITAL

1. INTRODUÇÃO

A determinação de amostras apropriadas para o diagnóstico de infecções do aparelho genital depende do local de infecção e dos microrganismos. Algumas infecções do aparelho genital feminino são devidas a microrganismos endógenos cuja patogenicidade é activada por factores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita.

É obrigatória a informação sobre o **tipo de amostra, data de colheita, idade** e uma **breve história clínica**.

2. AMOSTRAS

2.1. Aparelho genital feminino

- Exsudado vaginal / endocervical
- Exsudado uretral
- Exsudado rectal
- Endométrio
- Abscessos (Fundos de saco, Trompas, Gl. Bartholin)
- Líquido amniótico
- Úlceras genitais

2.2. Aparelho genital masculino

- Exsudado uretral
- Exsudado rectal
- Úlceras genitais
- Epidídimo
- Próstata
- Testículos

2.3. Amostras para o estudo de *Chlamydia trachomatis* e de *Mycoplasma / Ureoplasma*

3. COLHEITA E TRANSPORTE

APARELHO GENITAL FEMININO

1. Exsudado endocervical

- Introduzir o espéculo sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico estéril.
- Limpar o orifício externo do endocolo com compressa esterilizada.
- Introduzir uma zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron, cerca de 1 cm no endocolo e rodar.

- Colocar em meio de transporte com carvão
- Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa e efectuar esfregaço após o acto da colheita.
- O envio da amostra deve ser imediato.

2. Exsudado vaginal

- Introduzir o espéculo sem lubrificante ou humedecido com soro fisiológico estéril.
- Colher o exsudado do fundo de saco posterior e/ou paredes vaginais com zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron.
- Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa e efectuar esfregaço após o acto da colheita.

3. Exsudado uretral

- Se possível antes da 1ª micção. Se não é possível, esperar pelo menos uma hora após a última micção.
- Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze esterilizada.
- Introduzir uma zaragatoa fina e flexível com um movimento de rotação cerca de 1 cm dentro da uretra, para o exame directo.
- Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa, para o exame cultural. Colocar em meio de transporte com carvão.

4. Exsudado rectal

- Introduzir uma zaragatoa suavemente através do esfíncter anal.
- Rodar contra as criptas rectais, deixar 10-30 segundos para fixar os microrganismos e retirar.
- Evitar o contacto com matéria fecal. Quando a zaragatoa ficar contaminada com fezes, deve obter-se nova amostra.
- Introduzir a amostra em meio de transporte com carvão, que se deve manter à temperatura ambiente.

5. Endométrio

- Aspiração uterina através de catéter após prévia dilatação e descontaminação do cérvix.
- Enviar a amostra em recipiente estéril.
- No caso de suspeita de anaeróbios, transporte adequado.
- É recomendável realizar simultaneamente hemoculturas.

6. Abcessos (Fundos de saco, Trompas, Gl. Bartholin)

- Colheita cirúrgica por aspiração (no caso da Gl. Bartholin, descontaminar a pele com desinfetante não alcoólico).
- Enviar de imediato amostra até 5 ml num recipiente estéril e no caso de se suspeitar de anaeróbios, em meio de transporte adequado.

7. Líquido amniótico

- Colheita cirúrgica
- Enviar rapidamente a amostra, até 5 ml, ao laboratório em tubo estéril e/ou meio de transporte de anaeróbios.

8. Úlceras genitais

- Contactar previamente o laboratório de Microbiologia.
- ***Treponema pallidum*** - Limpar a superfície da lesão com gazes humedecidas em solução salina. Remover a crosta se presente, evitando sangrar. Pressionar a base da lesão até surgir um fluido claro e colher com uma pipeta Pasteur ou capilar. Colocar uma gota numa lâmina, cobrir com lamela e examinar imediatamente em microscópio de fundo escuro.
- ***Haemophilus ducrey*** - Limpar a superfície da lesão com solução salina. Fazer a colheita por aspiração com uma pipeta Pasteur ou com zaragatoa embebida em solução salina. Cultivar imediatamente em gelose chocolate enriquecida e suplementos antibióticos.

NOTA: Dispositivo intra-uterino "D.I.U." - não é produto para a realização de exame microbiológico.

APARELHO GENITAL MASCULINO

1. Exsudado uretral

- Fazer a expressão da uretra
- A amostra deve colher-se antes da 1ª micção da manhã. Se não é possível, esperar pelo menos uma hora após a última micção.
- Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze estéril.
- Introduzir uma zaragatoa fina e flexível com um movimento de rotação até 2 cm dentro da uretra, para o exame directo a realizar no acto da colheita.
- Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa para o exame cultural, que se deve introduzir em meio de transporte com carvão e manter à temperatura ambiente.
- O envio das amostras deve ser imediato.

2. Exsudado rectal

- Idêntico procedimento ao do aparelho genital feminino.

3. Abscessos (Epidídimo, Próstata, Testículos)

- Colheita cirúrgica
- Introduzir o aspirado até 5 ml em meio de transporte adequado.

4. Úlceras genitais

- Idêntico procedimento ao do aparelho genital feminino

AMOSTRAS PARA O ESTUDO de CHLAMYDIA TRACHOMATIS e MYCOPLASMA

Para o estudo da *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma* devem seguir-se as indicações de cada kit, já que a colheita de amostras, meios de transporte e conservação dependem da técnica utilizada.

Chlamydia trachomatis

- Os métodos culturais são mais sensíveis e específicos, mas devido à sua complexidade e custo não são efectuados na rotina da maior parte dos laboratórios.
- Os métodos não culturais incluem a pesquisa de corpos elementares, antígenos, ác. nucleicos, por técnicas de imunofluorescência directa, EIA ou sondas de ác. nucleicos.
- As amostras adequadas não são as secreções vaginais, mas sim os **raspados**, já que a *Chlamydia trachomatis* afecta as células do epitélio cilíndrico. Não são adequadas amostras vaginais.
- **Esfregaço endocervical** - Remover o excesso de muco com zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron. Inserir uma nova zaragatoa no canal endocervical e rodar. Evitar contacto com a mucosa vaginal. Transportar e conservar a amostra de acordo com a fonte comercial utilizada.
- **Esfregaço uretral** - Limpar qualquer exsudado. Inserir uma zaragatoa fina 2 a 4 cm na uretra e rodar. O doente não deve urinar pelo menos 1 hora antes da colheita. Restantes procedimentos iguais ao exsudado endocervical.

Nota - Nas técnicas de imunofluorescência, as preparações são realizadas no momento da colheita.

Mycoplasma / Ureoplasma

- Amostras - **exsudado vaginal, cervical ou uretral.**
- Colher a amostra com zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron e proceder de acordo com as indicações do fabricante.

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Exame DIRECTO

- **A fresco** - observar a presença ou não de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes.
- **Após coloração** - corar o esfregaço pelo método de Gram e pelo Giemsa (opcional) e descrever a flora existente

4.2. Exame CULTURAL - semear os produtos em:

	GS	GC polyViteX	M. N. gono.	M. Anaeróbios	Sabouraud
Mulher					
Endocérvix	X	X	X		X
Endométrio	X	X	X	X	
Gl. Bartholin	X	X	X	X	
L. Amniótico	X	X		X	
Recto	X	X	X		
Trompas	X	X	X	X	
Uretra	X	X	X		
Vagina	X				X
Homem					
Epidídimo	X	X	X		
Próstata	X	X	X		
Recto	X	X	X		
Testículos	X	X	X		
Uretra	X	X	X		

GS (Gelose sangue) - incubar em aerobiose a 35°C - 37°C, durante 48 horas, com obs. às 24 e 48 horas.

GC polyvitex (Gelose chocolate com polyvitex) - incubar em atmosfera de 5 a 7 % de CO₂ a 35°C - 37°C, durante 48 horas, com observação às 24 e 48 horas.

M.N. gono. (Meio de Neisseria gonorrhoeae - VCAT, NYC, Thayer - Martin) - incubar em atmosfera de 5 a 7 % de CO₂ a 35°C - 37°C, durante 72 horas, com observação às 24, 48 e 72 horas.

M.Anaeróbios (Meio para pesquisa de anaeróbios) - incubar em anaerobiose a 35°C - 37°C, durante 6 dias, com observação inicial às 48 horas e depois de 2 em 2 dias.

Sabouraud (Meio de Sabouraud) - Incubar em aerobiose a 30°C, durante 5 dias, com observação às 24 e 48 horas.

5. VALORIZAÇÃO CLÍNICA DAS INFECÇÕES DO APARELHO GENITAL FEMININO

A valorização clínica das culturas é efectuada de acordo com a informação clínica e o exame directo.

Assim, deve-se **pesquisar por rotina** :

Vulvo-vaginites

- *Candida albicans*
- *Trichomonas vaginalis*
- Vaginose bacteriana - diagnóstico essencialmente morfológico (nomeadamente a presença de "clue cells"). Eventualmente pesquisa de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp.
- *Actinomyces* spp. - associado ao uso de DIU
- *Listeria monocytogenes* - em abortos de repetição e infecções neonatais
- *Staphylococcus aureus* - associado ao uso de tampões
- *Streptococcus agalactiae* - valorizar em grávidas

Endocervicites

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *S. agalactiae* - grávidas
- *Actinomyces* spp. - assoc. ao DIU

Uretrite

- *Neisseriae gonorrhoeae*

Recto

- *Neisseriae gonorrhoeae*
- *Chlamydia trachomatis*

Endométrio (D. Inflamatória Pélvica)

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Endometrite (pós - parto)

- Bactérias anaeróbias
- *E. coli*
- *Enterococcus*
- *G. vaginalis*
- *Streptococcus agalactiae*

Trompas

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Bacteroides* spp.

Úlceras genitais (não efectuados por rotina)

- *Chlamydia trachomatis*
- *Haemophilus ducrey*
- *Treponema pallidum*

Líquido amniótico

- *Bacteroides* spp.
- *Fusobacterium* spp.
- *E. coli*
- *G. vaginalis*
- *S. agalactiae*
- *U. urealyticum*

Glândula de Bartholin

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *E. coli*
- *Proteus mirabilis*
- *U. urealyticum*

6. VALORIZAÇÃO CLÍNICA DAS INFECÇÕES DO TRACTO GENITAL MASCULINO

Pesquisar por rotina

Uretrite

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Recto

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseriae gonorrhoeae*

Úlceras genitais

- *Chlamydia trachomatis*
- *Haemophilus ducrey*
- *Treponema pallidum*

Epididimite

- *Chlamydia trachomatis*
- *Neisseriae gonorrhoeae*

Prostatite

- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas* spp.

Orquite

- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas* spp

PROCESSAMENTO GERAL DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA PESQUISA DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS

1. INTRODUÇÃO

- A metodologia de trabalho para o diagnóstico laboratorial das infecções por bactérias anaeróbias é complexa e dispendiosa, mas perfeitamente padronizada, de tal modo que, hoje, é possível proceder ao isolamento e identificação destas bactérias, na maior parte dos laboratórios de Microbiologia Clínica.
- A maioria das infecções por bactérias anaeróbias são endógenas, polimicrobianas, envolvendo várias espécies de bactérias anaeróbias e facultativas das mucosas próximas ao local de infecção. Estas bactérias podem ser responsáveis por qualquer tipo de infecção, apresentando porém, uma prevalência muito variável (por ex. 5% das bacteriémias, 80% dos abscessos cerebrais, etc.). O conhecimento da flora comensal das diferentes regiões das mucosas possibilita ao microbiologista desenvolver as estratégias mais adequadas ao diagnóstico laboratorial.
- O diagnóstico laboratorial das infecções por bactérias anaeróbias, envolve um conjunto de procedimentos que se baseiam em três pilares fundamentais: a qualidade dos produtos, a rapidez do transporte ao laboratório e a correção dos procedimentos laboratoriais.

2. COLHEITA e TRANSPORTE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A qualidade da colheita e o transporte dos produtos são essenciais para o diagnóstico, uma vez que o número de anaeróbios isolados, assim como o seu significado clínico, estão estreitamente relacionados com estes procedimentos.

2.1. Colheita

- A amostra deve ser obtida por **aspiração ou biópsia** e colhido de modo a evitar a contaminação com a flora comensal, associada ao local de infecção.
- **A utilização de zaragatoas como método de colheita não é aconselhada.**

2.2. Transporte

Deve ser rápido, de forma a preservar a viabilidade das bactérias e as proporções relativas das populações bacterianas nos produtos. Para isso, é aconselhada a utilização de **meios de transporte**. São geralmente constituídos por um meio semi-sólido pré-reduzido e esterilizado em recipiente próprio, com uma atmosfera sem oxigénio e que contém um indicador de oxidação-redução. Assim é fundamental:

- **Utilizar sempre meio de transporte** para o envio dos produtos.
- **Conservar** os produtos à **temperatura ambiente** até serem processados.

- Os produtos provenientes de curetagens, biópsias ou tecidos devem ser enviados em recipientes esterilizados, e colocados imediatamente numa atmosfera de anaerobiose (por exemplo Bio Bag, Gas Pack etc.)
- Os produtos colhidos em zaragatoas (apesar de pouco recomendáveis) devem ser enviados em meios de transporte apropriados (ex: BBL Anaerobe Systems etc.).
- **Não enviar produtos em seringa com agulha**, pelo risco de acidentes de trabalho, “picadas”, aquando do seu manuseamento.

3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Apenas devem ser processadas as amostras adequadas. Aconselha-se a execução de **triagem prévia**, atendendo aos seguintes critérios: natureza do produto, modo de colheita, transporte etc

Nunca processar :

- Exsudados colhidos com zaragatoa das seguintes regiões: naso e orofaringe, face interna da boca, gengiva, vagina, cérvix, uretra, recto, e de úlceras superficiais da pele.
- Expectoração, expectoração induzida, lavado e aspirado brônquico
- Urina (excepto punção suprapúbica) e fezes (excepto para *C. difficile*)
- Conteúdo gástrico ou do intestino delgado.

3.1 - Exame DIRECTO

- **Exame macroscópico** - pesquisar sinais sugestivos de infecção por bactérias anaeróbias: sangue, aspecto purulento, cheiro fétido, tecidos necrosados, presença de gás, fluorescência à luz ultra violeta, etc.
- **Exame microscópico** - observação de esfregaço do produto corado pelo método de Gram. Aconselha-se a **fixação do esfregaço com metanol** e recomenda-se a utilização da fucsina básica como corante de contraste. O exame microscópico pode fornecer diversos tipos de informação, tais como:
 - Qualidade da amostra
 - Número e tipo de microrganismos presentes no produto
 - Identificação presuntiva (correlação da morfologia bacteriana com o tipo de amostra)
 - Deficiências na metodologia utilizada (colheita, transporte, processamento dos produtos), traduzida por incapacidade de recuperação no exame cultural de todos os microrganismos observados no exame microscópico directo.
 - Sugerir a necessidade de utilização de meios de cultura adicionais e de outras metodologias: cromatografia gás-líquida, técnicas de imunofluorescência, etc.

3.2. EXAME CULTURAL

Uma informação clínica completa (tipo de infecção, doenças subjacentes, terapêutica antimicrobiana) combinada com a informação obtida do exame macroscópico e microscópico, é essencial, ao microbiologista, na escolha dos meios de cultura a utilizar para as sementeiras primárias.

3.2.1. Preparação e sementeira da amostra

O processamento da amostra deve ser **realizado em câmara de anaerobiose**. Se tal não for possível, o tempo de processamento em aerobiose, não deverá ultrapassar os 20 minutos.

- **Preparação da amostra:**

- **Produtos purulentos** devem ser homogenizados no agitador vertical (vortex)
- **Produtos de tecidos** (moles ou ósseos) devem ser colocadas em 1ml de meio líquido pré-reduzido (caldo de tioglicolato ou carne cozida), e triturados até obtenção de uma amostra homogénea.
- **Produtos enviados em zaragatoas** – mergulhar em 0,5 ml de meio líquido pré-reduzido, agitar no vórtex e proceder de seguida ao processamento da amostra.

- **Sementeira da amostra:**

Meios de cultura sólidos semear cada um dos meios em duplicado:

- **Produtos purulentos** - uma gota de produto por placa
- **Produtos não purulentos** – 2 a 3 gotas do produto por placa.

Meios de cultura líquidos semear **0,5 / 1 ml** de produto.

Incubar de imediato em **atmosfera de anaerobiose** (câmara, jarras, bolsas de anaerobiose) a **35 - 37°C durante 7 dias**. As culturas devem ser observadas às 48 horas. Os meios selectivos como o BBE (“Bacteroides Bile Esculina”) e EYA (Gelose Gema de ovo) podem ser observados às 24 horas.

Nota - a aplicação de discos impregnados com Kanamicina 1000µg e Penicilina 2 U. respectivamente, no 1º quadrante dos meios enriquecidos não selectivos, constitui um precioso auxílio na interpretação do exame cultural

3.2.2. MEIOS de CULTURA

- As bactérias anaeróbias são por via de regra nutricionalmente muito exigentes, requerendo meios de cultura com **base de gelose sangue**, suplementados com vitaminas, coenzimas e factores de crescimento.
- A preparação dos meios de cultura e as condições de armazenamento dos mesmos, são cruciais para o êxito na sua utilização. Os **meios devem ser frescos** (até 24 - 48 horas após preparação) e **conservados em atmosfera de anaerobiose**. É recomendado proceder à pré-redução dos meios de cultura primários, sempre que não haja possibilidade da utilização de meios frescos.

- Na prática, dada a diversidade das exigências nutricionais das bactérias anaeróbias e a natureza polimicrobiana das infecções, **aconselha-se o uso de meios nutritivos gerais enriquecidos não selectivos e selectivos**, o que, para além de aumentar a taxa de isolamento, proporciona uma economia de tempo, uma vez que facilitam o reconhecimento e isolamento de diferentes microrganismos .

A - Meios sólidos NÃO SELECTIVOS (enriquecidos)

Geralmente são meios gelosados enriquecidos com sangue de carneiro (5%), menadiona (1 µg/ ml), hemina (5 µg/ ml) com uma base variável (**Columbia, Brucella, Schaedler, Brain Heart Infusion, Wilkins Chalgren**, etc.).

B - Meios sólidos SELECTIVOS

Meios gelosados com agentes selectivos incorporados (antibióticos, bile etc.). Há múltiplos meios selectivos, não existindo porém unanimidade quanto à sua utilização. O ideal é combinar a utilização de dois ou três destes meios. São de uso comum:

- **Gelose sangue neomicina** (75 mg/L) : inibe o crescimento dos bacilos Gram negativo aeróbios.
- **Gelose sangue lacado com Kanamicina** (75 mg/L) e **Vancomicina** (7,5mg/L) selectivo para *Bacteroides* spp e *Prevotella* spp.
- **Gelose bile esculina** (BBE) com ou sem gentamicina (100mg/L): selectivo para *Bacteroides do grupo fragilis* e *Bilophila wadsworthia*.
- **Gelose cicloserina-cefoxitina-frutose** (CCFA): selectivo para *Clostridium difficile*.

C - Meios LÍQUIDOS:

- **Caldo de carne cozida** (grânulos) e **glicose**
- **Caldo de tioglicolato** enriquecido com hemina, menadiona e carbonato de sódio.

3.2.3 – SISTEMAS de INCUBAÇÃO

A escolha do sistema de incubação a utilizar é determinada pelo volume de trabalho, custo do equipamento e eventuais limitações de espaço. Alguns dos sistemas de incubação, são sofisticados e necessitam de equipamento complexo assim como de pessoal especializado, como é o caso dos **tubos rotatórios pré-reduzidos e esterilizados** (PRAS) e da **câmara de anaerobiose**. A incubação em **jarra de anaerobiose**, de fácil utilização, proporciona resultados na recuperação de bactérias anaeróbias com importância clínica, comparáveis aos sistemas referidos anteriormente.

1. **Jarra de anaerobiose** - sistema de incubação utilizado na maior parte dos laboratórios. São recipientes herméticos, simples, onde a atmosfera de anaerobiose pode ser conseguida de várias maneiras:
 - **Técnica de evacuação / substituição** – em desuso

- **Sistema gerador de Hidrogénio** (ex: Gás Pack®) - Este envelope é constituído por uma tablete de ácido cítrico e bicarbonato de sódio, e outra de borohidrato de sódio e cloreto de cobalto. A atmosfera de anaerobiose é efectuada pela adição de 10 ml de água ao envelope. Necessita da presença de catalisador.
 - **Sistema gerador de dióxido de carbono** (ex: Anaerogen ®) - Este envelope é constituído por ácido ascórbico. Não necessita de catalítico nem da adição de água para desenvolvimento da atmosfera de anaerobiose.
2. **Sistema gerador de anaerobiose em saco** - podem ser utilizados, como sistema de incubação, em situações em que apenas uma ou duas placas necessitem de ser estudadas.
 3. **Câmara de anaerobiose** – A atmosfera é conseguida pelo preenchimento da câmara com uma mistura gasosa cuja composição já foi acima referida. É necessária utilização de catalítico, que deve ser substituído diariamente. É necessário controlar a humidade, aconselhando-se a colocação de um recipiente com cristais de gel de sílica no fundo da câmara.
 4. **“Jarra de Espera”** - Recipiente banhado por fluxo contínuo de azoto, onde são colocados os meios de cultura inoculados e não inoculados, por períodos curtos (não mais de uma hora) até à incubação definitiva em atmosfera de anaerobiose.

A **monitorização do ambiente de anaerobiose** deve ser efectuada, utilizando **controles químicos** (rezasurina, azul de metileno, etc.) e **controles biológicos** (*Pseudomonas aeruginosa* inoculada em meio de citrato).

4. OBSERVAÇÃO das CULTURAS PRIMÁRIAS

- A observação das culturas primárias deve ser efectuada às 48 horas. Os produtos incubados em câmara de anaerobiose podem ser observados às 24 horas.
- **Todos os diferentes morfotipos das colónias devem ser semi-quantificados e subcultivados.** Para isso:
 - Comparar os resultados das culturas obtidas em anaerobiose com os obtidos em atmosfera com 3 a 5% de CO₂.
 - Pesquisar características macroscópicas típicas como corrosão do meio (“Pitting”), invasão (“swarming”), dupla hemólise, pigmentação etc.
 - Pesquisar a presença de fluorescência.
 - Fazer o exame microscópico (Gram) dos diferentes tipos de colónias com caracterização e registo das particularidades morfológicas e tinturiais observadas.
 - Executar subculturas em duplicado de todos os morfotipos, em meio não selectivo.
 - Incubar uma das subculturas numa atmosfera com 3 a 5% de CO₂ – Prova de aerotolerância).

- **Fazer subculturas dos meios líquidos das sementeiras primárias** sempre que:
 - Não tenha havido recuperação, nas sementeiras primárias, executadas em meios sólidos, dos microrganismos observados no exame microscópico directo.
 - Observada turvação das culturas primárias em meio líquido, sem obtenção de crescimento nas culturas primárias realizadas em meios sólidos.

- **Interpretação das culturas:**
 - Se estão presentes cinco ou mais morfotipos sugestivos de diferentes espécies de bactérias anaeróbias, não efectuar qualquer tipo de estudo. Informar - "presença de uma flora mista de bactérias anaeróbias".
 - Se observamos mais do que dois morfotipos de bactérias anaeróbias, (até um máximo de três), executar o exame microscópico directo (Gram) e uma prova de aerotolerância. Informar por ex. "bacilos anaeróbios Gram negativo".
 - Sempre que a cultura e o exame microscópico directo sugerir determinado microrganismo, acrescentar esse dado à informação, por ex. "bacilos anaeróbios Gram negativo sugestivo de *Fusobacterium*) - **Identificação nível 1.**
 - Se existe o predomínio de um microrganismo em relação aos outros, - efectuar uma identificação parcial ou rápida (Gram, catalase, indol, TIQ (teste de inibição pelos quimioterapicos) - **Identificação nível 2.**
 - Existência de uma cultura "pura" de bactérias anaeróbias - proceder ao seu estudo. Contudo a dimensão do estudo a efectuar deve ser ponderado de acordo com a situação clínica.
 - Os cocos anaeróbios devem ser sempre informados da identificação a nível de género (Ex: *Peptostreptococcus* spp.)

5. IDENTIFICAÇÃO

A identificação das bactérias anaeróbias pode ser efectuada a três níveis, pela combinação de várias metodologias (quadro n.º 1)

Quadro n.º 1 – Métodos de identificação mais importantes

1. Exame microscópico directo - coloração de GRAM
2. Fluorescência à luz ultravioleta
3. Comportamento aos antimicrobianos (TIA)
4. Fermentação dos carboidratos
5. Estudos enzimáticos
6. Cromatografia gás- líquida
7. Detecção de antigénios
8. Sondas de DNA
9. Análise da estrutura do peptidoglicano

A – Identificação nível 1

Informação das culturas primárias de acordo com as necessidades da atmosfera, coloração de Gram, e características macroscópicas das colónias – **Identificação apenas presuntiva**

B – Identificação nível 2

Para além das informações de nível 1, necessita da execução de alguns testes como: teste de inibição pelos antimicrobianos (TIA), catalase, “indol *spot*”, nitratos, urease, lipase etc, o que permite um **agrupamento preliminar das bactérias**, e, por vezes, mesmo uma identificação definitiva de alguns microrganismos

C – Identificação nível 3

Indicada sempre que possa estar presente um microrganismo muito virulento, ou que a sua identificação seja essencial para a prescrição terapêutica.

- Os métodos convencionais de identificação são laboriosos com períodos de incubação longos, baseados quer na fermentação dos carboidratos ou outras actividades bioquímicas, quer na determinação dos perfis de ácidos gordos de cadeia curta, resultantes da metabolização da glicose.
- Nos últimos anos desenvolveram-se vários sistemas alternativos de identificação - micrométodos - uns baseados na fermentação dos hidratos de carbono (API 20^A, Minetek II etc), outros na pesquisa de enzimas pré-formadas (ATB32A, AnIdent system, BBL CRYSTAL Anaerobe etc). A utilização destas metodologias permitem percentagens de identificação, a nível de espécies, de 60- 90%.
- A utilização de sondas de DNA em estudos de hibridização, com ou sem amplificação, não constituem, ainda, uma alternativa eficaz para o estudo das infecções ocasionadas por este tipo de microrganismos.

5.1 Provas rápidas de identificação

5.1.1. **Prova da Catalase** – ver capítulo GENERALIDADES

5.1.2. **Teste do “Indol spot”** – geralmente incluídos nos sistemas comercializados

5.1.3. **Teste de redução dos nitratos** - geralmente incluídos nos sistemas comercializados

5.1.4. **Teste de Inibição a discos impregnados com carga especial de antimicrobianos (TIA)**

- **Princípio** - A susceptibilidade ou resistência das bactérias a determinados discos permite o agrupamento preliminar de alguns géneros e espécies das bactérias anaeróbias.
- **Material** - discos impregnados com Vancomicina (5 µg) Colistina (10 µg) Kanamicina (1000 µg) SPS (5%) e Bile (20%)

- **Procedimento**

- Subcultivar o microrganismo numa placa de meio enriquecido, fazendo a sementeira por estria em três planos perpendiculares.
- Colocar os discos afastados uns dos outros 20 mm, num máximo de 4 discos por placa de 90 mm de diâmetro.
- Incubar as placas em anaerobiose 24 a 48 horas.

- **Interpretação:**

- 1. Vancomicina, Kanamicina, Colistina:**

Sensível – zona de inibição > 10 mm

Resistente – zona de inibição < 10mm

- 2. Polianatolsulfonato de sódio (SPS):**

Sensível - > 12 mm

Resistente - < 12 mm

- 3. Bile:** Sensível – qualquer zona de inibição à volta do disco

Resistente – nenhuma zona de inibição à volta do disco

- **Controlo de qualidade:**

- *B. fragilis* ATCC 25285
- *C. perfringens* ATCC 13124
- *F. necrophorum* ATCC 25286
- *P. anaerobius* ATCC 27337
- *P. asaccharolyticus* ATCC 29745
- *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845

5.1.5. Prova da Lecitinase

Princípio - a lecitinase hidrolisa a lecitina em diglicerídeos e fosforicolina. A formação destes compostos insolúveis causam uma opacidade à volta das colónias.

Material - meio de gelose gema de ovo (EYA)

Procedimento - Subcultivar o microrganismo em meio de gelose gema de ovo e incubar em anaerobiose 24 a 72 horas.

Interpretação:

- **Positiva: zona opaca e difusa do meio de cultura ao redor das colónias**
- Negativa: nenhuma alteração no meio de cultura

Controlo de qualidade:

C. perfringens ATCC 13124 - Positiva

C. sporogenes ATCC 11437 - Negativa

5.2 - Sistemas comercializados para Identificação

A – Sistemas bioquímicos de identificação

Princípio - Utilização ou consumo de substratos com produção de produtos finais, durante o crescimento dos microrganismos.

Limitações:

- Baixo desempenho na identificação dos microrganismos não sacarolíticos (*F. nucleatum*, etc.), e nos de crescimento lento (*Prevotella* spp).
- Algumas bactérias sacarolíticas reduzem o indicador, tornando difícil a interpretação da cor final das reacções.
- Reacções de indol são com frequência falso negativas
- Necessidade frequente da execução de testes suplementares

B- Sistemas enzimáticos de identificação

Princípio: Degradação de substratos cromogéneos por enzimas pré-formadas (glicosidases, aminopeptidases etc.).

Limitações:

- Não podem ser utilizadas subculturas efectuadas em meios ricos em açúcares (ex.: gelose Schaedler)
- Alguns microrganismos provenientes da cavidade oral podem não ser completamente identificados por estes métodos.
- Microrganismos subcultivados por longos períodos podem ocasionar reacções aberrantes e identificações incorrectas.
- Algumas reacções são difíceis de interpretar
- As identificações estão limitadas à base de dados existentes, podendo além disso não ter incluída alterações taxonómicas posteriormente definidas.
- Requerem um volume de inóculo grande.

C- Cromatografia gás líquida

É um método de identificação definitiva, somente realizado em laboratórios de referência, uma vez que requer tecnologia e equipamento especial. Aconselha-se a consulta de literatura apropriada.

6. TESTES de SUSCEPTIBILIDADE

6.1. Considerações Gerais

- Durante muitos anos as bactérias anaeróbias, com a excepção dos *Bacteroides* do grupo *fragilis*, apresentaram um padrão de susceptibilidade previsível. Hoje, o isolamento cada vez mais frequente de espécies produtoras de β -lactamases e de estirpes resistentes a grande número de antimicrobianos, leva os laboratórios de microbiologia à necessidade de reavaliar a metodologia utilizada e a melhorar o tipo de informação fornecida aos clínicos.

- Existem **bactérias anaeróbias** (*Bacteroides* do grupo *fragilis*, *Prevotella* spp, *Porphyromonas* spp, *Fusobacterium* spp, *B. gracilis*, *Bilophila wadsworthia*, *C. ramosum*, *C. clostridiforme*, etc.) **em que é obrigatória a execução dos testes de susceptibilidade, quer para orientação terapêutica** quer para estudos de susceptibilidade cumulativa capazes de orientar as terapêuticas empíricas sempre que estamos perante estes microrganismos.
- Os métodos de determinação da susceptibilidade das bactérias anaeróbias têm evoluído ao longo dos anos, suscitando ainda alguma controvérsia em relação a:
 - Quais os antimicrobianos a ensaiar.
 - Qual a metodologia a realizar.
 - Interpretação dos resultados
- Antibióticos como a **Penicilina, Cefoxitina, Clindamicina**, devem **sempre** ser **avaliados** uma vez que a sua eficácia é imprevisível. Relativamente ao **Metronidazol, Cloranfenicol, Carbapenemes**, não é consensual a sua avaliação, uma vez que o seu padrão de susceptibilidade permanece inalterável. Porém, é importante que estes antimicrobianos sejam **monitorizados ao longo do tempo**.
- Mesmo os métodos recomendados pelo NCCLS – **método de diluição em meio sólido (método de referência), e os métodos de macro e microdiluição em caldo**, não recolhem o consenso absoluto, uma vez que todos eles são complexos, e apresentam vantagens e inconvenientes (recomenda-se a consulta do NCCLS).
- A escolha do método deve ser ponderada de acordo com a finalidade pretendida com a execução dos testes de susceptibilidade. Para além da variabilidade técnica entre as várias metodologias, existem factores que constituem uma dificuldade na interpretação dos resultados tais como:
 - A **definição e determinação do ponto de inibição – CIM** de determinados antimicrobianos (β -lactâmicos), principalmente nas bactérias anaeróbias Gram negativo.
 - A **escolha das concentrações críticas** (“breakpoints”) adoptadas para a definição de resistência e susceptibilidade.
 - **Existência de “cluster”** de concentrações inibitórias mínimas isto é agrupamento de valores da CIM muito próximas ou iguais às concentrações críticas.
 - **Variabilidade na expressão dos resultados** – resultados expressos em valores de CIM50 e CIM90, em percentagens de resistência, em percentagens cumulativas de estirpes resistentes a todas as concentrações de antimicrobianos estudadas.
- É consensual que **os testes de susceptibilidade não devem ser executados por rotina, e que a pesquisa de β - lactamases deve ser efectuada em todos os bacilos Gram negativo**, uma vez que pode fornecer informações para orientação terapêutica, em tempo útil.
- Assim o **teste de susceptibilidade deve ser efectuado nas seguintes situações:**
 - Em todos os microrganismos isolados de locais geralmente estéreis (SNC, sangue etc.)
 - Nas situações clínicas, que requerem terapêuticas prolongadas (endocardite, osteomielite).
 - Na ausência de resposta à terapêutica empírica instituída.

- Na monitorização periódica dos padrões de susceptibilidade dentro de uma instituição.
- No estudo da susceptibilidade das bactérias anaeróbias a novos agentes antimicrobianos.

6.2. Métodos de estudo da susceptibilidade

Apesar de todos os métodos apresentarem limitações, a escolha do método para a determinação da susceptibilidade das bactérias anaeróbias deve depender, do tipo de laboratório e da finalidade da sua execução. Em virtude da sua flexibilidade e da facilidade de execução o **ε-test®** é um método interessante, simples e eficiente (com boa precisão e exactidão) para a determinação da susceptibilidade das bactérias anaeróbias.

IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVO

INTRODUÇÃO

Os Cocos Gram positivo aeróbios dividem-se na família Micrococcaceae em dois grandes grupos:

Catalase POSITIVA nos géneros:

- *Staphylococcus*
- *Micrococcus*
- *Stomatococcus*
- *Planococcus*

Catalase NEGATIVA nos géneros:

- *Streptococcus*
- *Enterococcus*
- *Leuconostoc*
- *Pediococcus*
- *Aerococcus*
- *Gemella*

Para identificação destas bactérias é fundamental:

- Observação da sua **morfologia** ao microscópio após coloração pelo **método de Gram**.
- O **aspecto macroscópico das colónias em meios de cultura sólidos** (selectivos ou não selectivos) que pode sugerir a possível identificação.
- **Provas específicas de identificação**

GÉNERO STAPHYLOCOCCUS

1. Descrição do Género

- São **cocos Gram positivo** (0.5 a 1.5 µm de diâmetro) que se dispõem preferencialmente **em cachos**, mas também podem aparecer **isolados**, aos **pares**, em **tétradas**, em **pequenas cadeias**.
- São imóveis, não formam esporos e habitualmente são **catalase positiva** e desprovidos de cápsula. A maioria das espécies é anaeróbia facultativa.
- O Género *Staphylococcus* compreende actualmente 27 espécies.

2. HABITAT

- O género *Staphylococcus* existe em abundância na natureza, encontrando-se principalmente na pele e mucosas dos mamíferos e aves.

3. Significado CLÍNICO

- Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente agentes etiológicos de infecção.
- A espécie ***S. aureus*** é a causa mais frequente de infecção no homem dentro deste género.
- Os ***Staphylococcus coagulase negativo*** se bem que sejam considerados saprófitas ou de baixa patogenicidade para o homem, são cada vez mais valorizados como agentes oportunistas de infecção; sempre que isolados de locais habitualmente estéreis tais como sangue, L.C.R. e infecções associadas a próteses e catéteres.

4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

4.1. Exame DIRECTO - coloração de Gram

4.2. Exame CULTURAL

- Em **gelose sangue**, as colónias desenvolvem-se a 35°C em 18-24h e apresentam-se com 1 a 3 mm de diâmetro com superfície lisa e brilhante, bordo inteiro, consistência “gordurosa”, aspecto opaco, de cor variável entre o branco e o amarelo; verifica-se por vezes a existência de **hemólise**.
- As amostras provenientes de locais com flora mista devem ser semeadas em meios selectivos como por exemplo **manitol salgado** ou **gelose com colistina e ácido nalidixico** (Columbia ANC).

4.3. Prova da Catalase - positiva

4.4. Prova da Coagulase

- Teste da coagulase em lâmina
- Teste da coagulase em tubo
- Proteína A (ex.: Staphaurex®)

4.5. Teste da Deoxiribonuclease (DNase)

4.6. Teste da susceptibilidade à Novobiocina

4.7. Sistemas Comerciais de Identificação da espécie

GÉNERO STREPTOCOCCUS e outros COCOS GRAM POSITIVO e CATALASE NEGATIVA

Descrição do Género

- Cocos **Gram positivo aos pares (diplococos)** ou **em cadeia**.
- A maioria das espécies é anaeróbio facultativo, imóveis, capsulados ou não capsulados.

***Streptococcus* β hemolítico do Grupo A de Lancefield (*S. pyogenes*)**

1. Significado CLÍNICO

É a causa mais frequente da amigdalite bacteriana nas crianças dos 5 aos 10 anos de idade.

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1. Exame DIRECTO

- A coloração de Gram mostra **cocos Gram positivo**, esféricos de 0,7 a 0,9 μm que ocorrem em cadeias de comprimento variável (quando observado na amostra ou em cultura de meio líquido).

2.2. Exame CULTURAL

- **Gelose sangue** - incubação a 35°C numa atmosfera com 5 % de CO₂, 18 a 24 horas. As colónias apresentam-se com 0,5 a 1mm de diâmetro, transparentes ou translúcidas, pouco convexas de superfície lisa e bordo inteiro com larga zona de **β hemólise** quando o sangue utilizado é de equídeo ou carneiro.
- Nalguns produtos pode usar-se meio líquido de enriquecimento (ex.: Todd-Hewitt) para aumentar a sua recuperação.

2.3. Prova da Catalase - negativa

2.4. Teste de susceptibilidade à Bacitracina (disco de 0,04 U) - positiva (identificação presumptiva)

2.5. Identificação Serológica – o método de referência é extração de Lancefield que, pela sua dificuldade técnica, está actualmente substituído por métodos comercializados.

***Streptococcus* β hemolítico do grupo B de Lancefield (*S. agalactiae*)**

1. Significado CLÍNICO

A importância do *Streptococcus* do grupo B advém do seu potencial infeccioso no recém-nascido.

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1. Exame DIRECTO

A coloração de Gram mostra **cocos Gram positivo**, esféricos de 0,7 a 0,9 μm que ocorrem em cadeias de comprimento variável (quando observado na amostra ou em cultura de meio líquido).

2.2. Exame CULTURAL

Para além da sementeira em meio sólido deve ser também semeado em meio líquido (ex: Todd-Hewitt).

É aconselhado o uso de **gelose sangue** incubado a 35°C numa atmosfera com 5 % de CO₂. As colónias após 18-24h de incubação apresentam-se com 0,5 a 1 mm de diâmetro, transparentes ou translúcidas, pouco convexas de superfície lisa e bordo inteiro com **estreita zona de β hemólise** quando o sangue utilizado é de equídeo ou carneiro.

2.3. Prova da catalase - negativa

2.4. Identificação serológica – o método de referência é extracção de Lancefield que, pela sua dificuldade técnica, está actualmente substituído por métodos comercializados.

Streptococcus pneumoniae

1. Significado CLÍNICO

Fazendo parte da flora indígena da orofaringe é a principal causa de **pneumonia da comunidade** e frequente causa de **otite média, sinusite e meningite**.

2. Diagnóstico LABORATORIAL

2.1. Exame DIRECTO

A coloração de Gram mostra **diplococos Gram positivo** de 0,8 a 1µ de tamanho, ovóides ou lanceolados, com as extremidades mais largas opostas, por vezes capsulados.

2.2. Exame CULTURAL

Microrganismo anaeróbio facultativo que após 18-24h de incubação a 35°C numa atmosfera com 5 % de CO₂ apresenta colónias, na **gelose sangue**, com cerca de 1 mm de diâmetro, redondas de bordo inteiro e circundadas por uma zona de **α hemólise**. Podem ser mucoides. A superfície pode ser plana ou com depressão central.

2.3. Teste da Optoquina

2.4. Teste da Solubilidade em Bilis

2.5. Identificação Serológica

Enterococcus spp

1. Significado CLÍNICO

Dentro dos cocos Gram positivo é o agente mais frequentemente associado a **infecção urinária**. Está também muitas vezes associado à **Infecção Hospitalar**.

2. Diagnóstico LABORATORIAL

2.1. Exame DIRECTO

A coloração de Gram mostra **cocos Gram positivo ovóides** ou em **curtas cadeias**.

2.2. Exame CULTURAL

Embora não necessite de sangue para se desenvolver em cultura, as colónias em **gelose sangue** após 18-24h de incubação a 35°C são de cor branca ou acinzentada com 0,5 a 1,5 mm de diâmetro e convexas. Após incubação prolongada (superior a 48h) podem apresentar **α** , **β** ou ausência de **hemólise**

2.3. Prova da Catalase - negativa

2.4. Teste da BÍlis-Esculina

2.5. Sistemas Comerciais de Identificação Bioquímica – permitem a identificação da espécie

Streptococcus viridians

1. Significado CLÍNICO

Microrganismo frequente como agente de **endocardite** sub-aguda bacteriana.

2. Diagnóstico LABORATORIAL

2.1. Exame DIRECTO

A coloração de Gram mostra **cocos Gram positivo** em cadeia.

2.2. Exame CULTURAL

Microrganismo exigente que necessita de **meios enriquecidos com sangue**. Após 18-24h de incubação a 35°C em atmosfera de 5 % de CO₂, as colónias em **gelose sangue** apresentam diâmetro variável entre 0,1 a 0,5 mm de diâmetro. Podem ter **α** ou **ausência** de **hemólise**.

2.3. Sistemas Comerciais de Identificação Bioquímica – Permitem a identificação da espécie

BACILOS GRAM POSITIVO

GÉNERO *LISTERIA*

Do género *Listeria* só a *Listeria monocytogenes* e a *Listeria ivanovii* estão associadas com doença no Homem.

A *Listeria monocytogenes* é a espécie mais frequentemente isolada nos laboratórios clínicos e a sua patogenicidade é bem conhecida no Homem.

Listeria monocytogenes

1. HABITAT

A *Listeria monocytogenes* é encontrada numa ampla variedade de ambientes. Pode ser isolada na flora comensal de vários animais tais como alguns roedores, no aparelho gastrointestinal do Homem saudável e a partir de fontes ambientais tais como água de rios, vegetação em decomposição, esgotos etc. Pode ainda ser isolada no leite e derivados, quer pasteurizados quer não pasteurizados.

2. Significado CLÍNICO

- A *Listeria monocytogenes* causa mais frequentemente infecções em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e doentes imunodeprimidos.
- As infecções mais frequentes são a **meningite** e a **sepsis**. Alguns doentes podem ter uma bacteriémia assintomática. A *Listeria monocytogenes* pode ainda causar infecções localizadas na pele, endoftalmites, endocardites, linfadenites, artrites, osteomielites, abscessos cerebrais, peritonites e colecistites.

3. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram positivo, não esporulados, geralmente curtos, mas ocasionalmente dispostos aos pares e em cadeias curtas.

3.2. Exame CULTURAL

Meios de cultura - Gelose sangue:

- Incubação a 35° C durante 24 horas em **aerobiose**, atmosfera de **5% de CO₂** ou em **anaerobiose**.
- As colónias são pequenas, translúcidas e acinzentadas, com pequeno halo de **β-hemólise**.

3.3. Testes de IDENTIFICAÇÃO

- **Catalase POSITIVA**
- **Teste da mobilidade** - realizar com um meio semi-sólido (ex.: meio de Sims), inocular por picada com fio recto e incubar à temperatura ambiente. Observa-se uma zona de crescimento em “chapéu de chuva” 2 a 5 mm abaixo da superfície do meio.
- **Crescimento a 4º C**
- **Hidrólise da esculina**
- **Produção de H₂S**
- **Identificação definitiva** - testes bioquímicos comercializados

GÉNERO *CORYNEBACTERIUM*

- O género *Corynebacterium* incluía um grupo muito heterogéneo de bactérias. Durante a última década, taxonomistas redefiniram o género *Corynebacterium* e várias espécies foram reagrupadas em outros géneros.
- Este género inclui espécies aeróbias e anaeróbias facultativas, são na sua maioria **Catalase POSITIVA**. São imóveis, com excepção do *Corynebacterium aquaticum*.

HABITAT e Significado CLÍNICO

- As bactérias do género *Corynebacterium* encontram-se amplamente distribuídas na natureza (solo e água) e fazem parte da flora da pele e mucosas do Homem.
- Exceptuando-se o *Corynebacterium diphtheriae*, os isolamentos em produtos biológicos de bactérias deste género, são geralmente considerados contaminantes. No entanto, o seu repetido isolamento em amostras normalmente estéreis (sangue, LCR e outros líquidos biológicos) sugere a sua implicação na etiologia do processo infeccioso.

Corynebacterium diphtheriae

3. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram positivo, pleomórficos, rectos ou ligeiramente curvos e grossos, não formam esporos.

3.2. Exame CULTURAL

Meios não selectivos

- **Gelose sangue** - crescem algumas estirpes de *Corynebacterium* que não crescem nos meios com telurito.

- **Meio de Loeffler** – Utiliza-se para o diagnóstico presuntivo de *Corynebacterium diphtheriae* nos exsudados faríngeos. Este meio favorece a formação de grânulos que coram metacromáticamente com colorações simples, por ex: com azul de metileno de Loeffler.

A morfologia das colônias em gelose sangue é semelhante às colônias dos outros bacilos aeróbios Gram positivo, portanto terão que ser subcultivadas para meio selectivo ou identificadas bioquimicamente.

Meios selectivos

São **meios com telurito de potássio** - O telurito de potássio inibe o crescimento da maior parte das bactérias saprófitas do aparelho respiratório superior permitindo o crescimento dos *Corynebacterium*.

- **Gelose sangue com telurito e cistina** - o meio com cistina e telurito é mais fácil de preparar e tem uma durabilidade de cerca de um mês. Neste meio, todas as espécies de *Corynebacterium* produzem colônias de cor acinzentada / preta após 24 horas de incubação a 35° C.
- **Meio de Tinsdale** - o meio de Tinsdale é mais difícil de preparar e deve ser usado no prazo de 2 a 3 dias após a preparação. As colônias de *Corynebacterim diphtheriae* são facilmente diferenciadas das dos outros *Corynebacterium* porque têm um halo acastanhado.

3.3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO

- **Identificação Presuntiva** - presença de grânulos metacromáticos observados em esfregaço realizado a partir da cultura em meio de Loeffler.
- **Identificação Definitiva** - testes bioquímicos comercializados.
- **Testes de TOXOGENICIDADE** - estirpes de *C. diphtheriae* não toxigénicas podem ser isoladas da orofaringe e nasofaringe de pessoas saudáveis. Assim, por razões clínicas e epidemiológicas, a identificação laboratorial definitiva das estirpes patogénicas deve incluir testes de toxigenicidade (Teste de toxigenicidade in vitro “Elek modificado” → consultar manuais de microbiologia).

Corynebacterium spp

As bactérias do género *Corynebacterium* são frequentemente isoladas de uma grande variedade de amostras clínicas.

3. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram positivo, não esporulados, pleomórficos que variam de curtos cocobacilos a longos bacilos.

3.2. Exame CULTURAL

Meio de cultura - Gelose sangue - Incubação 18 a 24 horas em 5 % de CO₂.

3.3. Testes de IDENTIFICAÇÃO

- Testes bioquímicos comercializados

GÉNERO *ERISPELOTHRIX*

- No género *Erysipelothrix* são conhecidas duas espécies, o *E. rhusiopathiae* e o *E. tonsillarum*. O *Erysipelothrix rhusiopathiae* é a única espécie deste género que é agente patogénico para o Homem.

Erysipelothrix rhusiopathiae

1. HABITAT

Erysipelothrix rhusiopathiae encontra-se amplamente distribuído na natureza e tem sido isolado do solo, alimentos e água presumivelmente contaminados por animais infectados. Tem sido isolado do aparelho gastrointestinal de suínos saudáveis e acredita-se ser o porco doméstico o maior reservatório.

2. Significado CLÍNICO

Foi isolado pela primeira vez no Homem a partir de lesões da pele que se convencionou chamarem de “erisipeloides”. É uma forma de celulite que envolve habitualmente a pele das mãos e dedos. É uma doença profissional em pessoas que manipulam carne, peixe, crustáceos e galináceos. Pensa-se que a bactéria entra na pele através de soluções de continuidade da mesma. Raramente pode ocorrer sepsis e endocardite.

3. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram positivo, pequenos, finos, rectos ou ligeiramente curvos. Às vezes formam longos filamentos.

3.2. Exame CULTURAL

Meios de cultura:

- **Gelose Sangue e Gelose chocolate** - incubar a 35° C em aerobiose até 48 horas.
- **Meio líquido de enriquecimento com 1% de glucose** - incubação a 35° C em atmosfera de 5 % de CO₂.

As colónias podem ser planas ou rugosas. As colónias planas podem medir entre 0,5 e 1 mm e são convexas, circulares e transparentes. As colónias rugosas são maiores, baças e têm um bordo fimbriado. Após prolongado período de incubação, pode aparecer uma descoloração esverdeada do meio adjacente às colónias - α hemólise.

3.3. Testes de IDENTIFICAÇÃO

- Catalase **NEGATIVA**
- Testes bioquímicos comercializados

GÉNERO *RHODOCOCCUS*

Do género *Rhodococcus*, a espécie *Rhodococcus equi* é a mais frequentemente responsável por infecções no Homem, embora outras espécies tenham sido referidas como agentes causadores de infecções oportunistas.

Rhodococcus equi

1. HABITAT

O *Rhodococcus* encontra-se amplamente distribuído no solo e em alguns animais. O solo pode ser a origem das infecções no Homem que não contacta com animais. A infecção no Homem pode ser adquirida por inalação do agente a partir destes reservatórios.

2. Significado CLÍNICO

A infecção pulmonar é a mais frequente, nomeadamente pneumonias invasivas com cavitação particularmente em doentes com SIDA. A disseminação para o cérebro, fígado, baço e outros órgãos também é frequente nestes doentes.

3. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram positivo, curtos e às vezes cocóides, disposição “difteroide” ou em paliçada.

3.2. Exame CULTURAL

Meio de cultura - **Gelose sangue**

Incubar a 35° C em aerobiose 18 a 24 horas. As colónias são lisas, brilhantes e com uma cor que pode variar de **rosa salmão a alaranjada** após incubação prolongada

3.3. Testes de IDENTIFICAÇÃO

- Catalase **POSITIVA**
- Testes bioquímicos comercializados.

GÉNERO NOCARDIA

O género *Nocardia* é um dos géneros pertencentes à família das *Nocardiaciae*. São actinomicetos aeróbios parcialmente ácido-resistentes, no entanto a presença desta propriedade é variável estando dependente das condições da cultura e da própria estirpe. Os microrganismos pertencentes ao género *Nocardia* são **Gram positivo, variavelmente ácido-resistentes, catalase POSITIVA e aeróbios estritos.**

1. HABITAT

A maior parte das espécies é encontrada normalmente no solo e na água.

2. Significado CLÍNICO

Das 11 espécies incluídas no género *Nocardia*, só a ***N. asteróides*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*** e a ***N. transvalensis*** estão descritas como sendo patogénicas para o Homem. A *Nocardia asteróides* é responsável por mais de 80 % das infecções nos humanos.

As infecções a *Nocardia* podem ser adquiridas quer por inoculação traumática quer por inalação. A *Nocardia* spp pode causar infecções na pele, infecções pulmonares invasivas e infecções sistémicas.

3. IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

3.1. Exame DIRECTO

- **Bactérias Gram positivo, ramificadas ou parcialmente ramificadas e filamentosas.**
- São ácido-resistentes quando coradas por coloração de Ziehl-Neelsen (utilizar Ácido Sulfúrico a 1% para descorar).

3.2. Exame CULTURAL

Meios de cultura

- **Gelose sangue**
 - **Gelose chocolate**
 - **Meio de Sabouraud dextrosado**
- A maior parte dos actinomicetos aeróbios não tem exigências nutricionais complexas e cresce nos meios de cultura de rotina laboratorial tais como a **gelose sangue, gelose chocolate** ou **meio de Sabouraud dextrosado**. No entanto, como é um microrganismo de crescimento lento, a flora comensal que pode estar presente em determinadas amostras clínicas pode mascarar o seu crescimento.

- Podem ser semeados os meios de Lowenstein e Middlebrook 7H10 que facilitam a identificação presumptiva destes agentes.
- Incubar a 35° C e a 30° C, durante 2 a 3 semanas. A morfologia das colónias nos meios de rotina é extremamente variável: são aderentes, rugosas, secas, quebradiças e com uma cor que pode variar do branco cal ao laranja acastanhado.

3.3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - Identificação presumptiva

IDENTIFICAÇÃO COCOBACILOS GRAM NEGATIVO

GÉNEROS *NEISSERIA* e *MORAXELLA*

1. INTRODUÇÃO

- Para a identificação destas bactérias é fundamental a observação das características das colónias assim como a sua morfologia após coloração pelo método de Gram.
- Estes microrganismos são **cocos Gram negativo**. Organizam-se em **pares ou pequenas cadeias**, sendo que os pares apresentam os lados adjacentes achatados com a **forma de grão de café ou de rim**. A divisão celular é em dois planos em ângulo recto por vezes com a formação de tetradas.
- As células individuais variam em tamanho de 0,6 a 1,5 µm dependendo da espécie, local de isolamento e idade da cultura.
- São **imóveis e não produzem esporos**.
- As espécies patogénicas para o Homem são, geralmente, exigentes nas necessidades de crescimento, com um desenvolvimento óptimo a 35º C e metabolizam poucos ou nenhuns hidratos de carbono. São capnofílicas e desenvolvem-se melhor em atmosfera húmida.
- Todas as espécies são **oxidase positiva e catalase positiva** (excepto a *N. elongata* que é catalase negativa).
- O habitat natural destas bactérias são as membranas mucosas dos animais de sangue quente.

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1. Meios de CULTURA

1.1. Produtos biológicos normalmente estéreis:

- **Gelose sangue**
- **Gelose chocolate simples e/ou com suplemento polivitamínico**

1.2. Produtos biológicos com flora indígena

- **Meios selectivos para isolamento de *Neisseria* spp.:**
 - Thayer-Martin modificado (MTM)
 - Gelose chocolate ou com sangue lacado suplementado com VCAT ou LCAT

Os meios selectivos contêm agentes antimicrobianos que inibem outros microrganismos e permitem o isolamento selectivo quer de *N. gonorrhoeae* quer de *N. meningitidis*

2. INCUBAÇÃO

- Em aerobiose, atmosfera húmida com 5% de CO₂ a 35º C.
- Deve ser observado o crescimento até às 72 horas

3. Morfologia das COLÓNIAS e IDENTIFICAÇÃO

- A morfologia das colónias é variável. Têm opacidade variável, tendem a ser pequenas, brilhantes e elevadas. Nas subculturas estas características podem modificar-se. As culturas devem observar-se às 24, 48 e 72 horas. Devem ser feitos esfregaços das colónias para comprovação da morfologia característica.

Neisseria gonorrhoeae

- Às 24 horas de incubação apresenta colónias branco opaco elevadas e brilhantes que reflectem a luz.
- Para a identificar deve efectuar-se o **teste da oxidase** e **Gram das colónias** suspeitas, o que permite uma identificação presuntiva se isolada de amostra urogenital.
- A identificação confirmatória da espécie deve ser feita com testes bioquímicos (mais frequentemente) ou com métodos serológicos.

Neisseria meningitidis

- Os meningococos não são tão exigentes como os gonococos, embora as amostras de produtos com suspeita de infecção a este agente devam ser semeadas em meios enriquecidos.
- Embora estas bactérias não se desenvolvam bem em meios líquidos as amostras de locais habitualmente estéreis podem também ser inoculadas nestes meios.
- Morfologicamente as colónias são maiores que as dos gonococos, atingindo um diâmetro superior a 1 mm às 18 horas de incubação. São redondas e convexas com uma superfície lisa, húmida e brilhante e um bordo inteiro. As culturas jovens apresentam uma consistência “gordurosa” e as colónias emulsificam com facilidade em soro fisiológico e com tempo há uma autólise e as colónias ganham uma consistência elástica e pegajosa.
- A identificação presuntiva faz-se pelo teste da oxidase e pela coloração de Gram.
- A confirmação é feita por testes bioquímicos.
- A serogrupagem é muito importante para fins epidemiológicos, e deve ser feita exclusivamente em Laboratórios de Referência.

Outras *Neisseria* spp.

- Outras *Neisseria* sp. podem fazer parte da flora indígena da nasofaringe e da orofaringe.
- A *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*, *N. flavescens*, *N. subflava*, *N. sicca*, *N. mucosa* e *N. Elongata*, embora sejam consideradas de baixa virulência, em alguns casos têm sido responsabilizados como agentes etiológicos de infecções.
- A *N. lactamica* e a *N. polysaccharea* são as que mais se confundem com a *N. meningitidis* porque crescem em meio selectivo para gonococo e fermentam a glucose e a maltose.

Moraxella catarrhalis

- É considerada causa de doença humana desde o principio do século XX embora só há cerca de 20 anos tenha havido uma clara apreciação do seu envolvimento na patogenia de algumas doenças.
- A *M. catarrhalis* tem sido responsável como agente de infecção do aparelho respiratório (otite média aguda, sinusite, e infecções bronco pulmonares). Estão também descritos casos de endocardite e meningite.
- O seu isolamento faz-se em **gelose sangue** ou **gelose chocolate**, com incubação a 35° C em aerobiose com uma atmosfera de 5 % de CO₂. Não se desenvolve em MacConkey.
- As colónias são pequenas, redondas, inteiras, esbranquiçadas, de 3 a 5 mm de diâmetro. Não aderem ao meio, deslizam inteiras quando arrastadas com a ansa.
- É **catalase e oxidase positivas**, não fermenta os açucares, produz **DNase**, reduz os nitratos e produz butirato esterase.
- Um dos testes mais úteis é a comprovação da produção de **DNase**. A identificação pode também fazer-se (ou confirmar-se) por testes bioquímicos (geralmente comercializados).

GÉNERO *HAEMOPHILUS*

Este género inclui várias espécies:

- *H. influenzae*
- *H. parainfluenzae*
- *H. haemolyticus*
- *H. parahaemolyticus*
- *H. aphrophilus*
- *H. paraphrophilus*
- *H. segnis*
- *H. ducreyi*

- As espécies deste género **fazem parte da flora habitual do aparelho respiratório superior** humano e dos animais (com excepção do *H. ducrey*). As espécies consideradas patogénicas para o homem são: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus* e *H. ducreyi*.
- As infecções humanas variam desde as não complicadas e facilmente tratáveis (conjuntivite, otite média aguda, sinusite, etc.) até às invasivas e potencialmente mortais (pneumonia, meningite, pericardite, endocardite, etc.) – geralmente causadas pela espécie *H. influenzae*.
- O *H. ducreyi* é agente patogénico obrigatório exclusivamente humano (provoca a doença sexualmente transmitida designada por «cancróide»).

1. Exame DIRECTO

Na coloração de GRAM geralmente apresentam a forma de **cocobacilos Gram negativo pleomórficos**.

2. Exame CULTURAL

Meios de cultura: - **gelose chocolate**
- **gelose com sangue de cavalo ou coelho** (têm hemina e NAD).

A maioria das espécies de *Haemophilus* exigem **hemina (factor X)** e **NAD (factor V)** para o seu desenvolvimento, por isso não crescem em gelose com sangue de carneiro (que só tem hemina) nem em MacConkey.

- Algumas espécies bacterianas produzem NAD pelo que, na gelose com sangue de carneiro, se podem desenvolver colónias de *Haemophilus spp* à volta dessas colónias produtoras de NAD – fenómeno de «satelitismo».
- As espécies de *Haemophilus* não se desenvolvem bem nos meios líquidos habitualmente usados no laboratório, incluindo os meios comercializados para hemoculturas.
- Desenvolvem-se em aerobiose, mas o seu crescimento é estimulado com atmosfera suplementada com 5% de CO₂.
- Geralmente observa-se crescimento após 24 h de incubação a 35°C, mas pode ser necessário prolongar a incubação até 48-72 h. (O *H. ducreyi* exige período de incubação de 7 dias).
- As colónias são pequenas, redondas, convexas ou achatadas, translúcidas com a zona central mais opaca e com cheiro característico a «ninho de ratos».

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO

- **Podem ter reacção positiva para o teste da oxidase e a reacção é também variável para a catalase.**
- Tradicionalmente, a identificação consiste na **demonstração da exigência dos factores de crescimento X e/ou V.**

O método mais vulgar para demonstrar essa exigência consiste em colocar discos ou tiras de papel de filtro impregnados respectivamente dos factores X, V e XV sobre um meio de cultura não suplementado (gelose simples, Mueller-Hinton, Trypticase, etc) o qual foi previamente inoculado com uma suspensão (0.5 de McFarland) do microrganismo. Após 18-24 h de incubação verifica-se se há crescimento bacteriano à volta dos discos/tiras (existem comercializados discos e tiras impregnados de factores de crescimento). (Quadro n.º 1)

- A identificação também pode ser feita pelo **Teste da Porfirina** - detecta a presença de enzimas que convertem o ácido alfa-aminolevulínico (ALA) em porfirinas ou protoporfirinas. As espécies que requerem o factor X não possuem essas enzimas (teste negativo). Este teste pode ser feito em caldo, gelose ou disco. As porfirinas são detectadas por iluminação com luz UV (360 nm) apresentando fluorescência vermelha.

QUADRO 1

ESPÉCIE	FACTOR X	FACTOR V	BETA-HEMÓLISE	FERMENTAÇÃO GLUCOSE	FERMENTAÇÃO SACAROSE	FERMENTAÇÃO LACTOSE	FERMENTAÇÃO MANOSE	CATALASE
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>H. influenzae</i> biótipo <i>aegypticus</i>	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	
<i>H. parainfluenza</i>	-	+	-	+	+	-	+	V
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	+	+	-	-	V
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	+	+	+	+	-

+ reacção positiva - reacção negativa V reacção variável;

- A identificação de espécie também se pode fazer recorrendo a **testes bioquímicos** geralmente comercializados (ex. Api NH®, Vitek NHI®). (Quadro 1)
- A detecção dos **antigénios capsulares** do *H. Influenzae* tem interesse epidemiológico e em investigação mas tem pouco interesse clínico.
- A detecção de antigénios ou a utilização de **sondas moleculares**, quando disponíveis no mercado, poderão revelar-se muito úteis na detecção do *H. ducreyi* que é dificilmente cultivável.

GÉNERO *BORDETELLA*

As 3 espécies principais são:

- *B. pertussis*
 - *B. parapertussis*
 - *B. bronchiseptica*
- A *B. pertussis* e *B. parapertussis* são agentes **patogénicos exclusivamente humanos** e causam um quadro de infecção respiratória alta designada por «**tosse convulsa**». A sua incidência diminuiu muito depois da utilização generalizada da vacina.
 - A infecção humana por *B. bronchiseptica* é muito rara estando quase sempre relacionada com história de contacto com animais.

1. Exame DIRECTO

São **cocobacilos Gram negativo**, embora corem mal pelo método de Gram.

2. Exame CULTURAL

- A colheita do exsudado naso-faríngeo para exame cultural tem, obrigatoriamente, de ser realizada com zaragatoa de alginato de cálcio.
- **Meio de cultura: Meio de Bordet-Gengou** (*B. pertussis* e *B. parapertussis* não se desenvolvem bem em gelose sangue nem em gelose chocolate)
- **Incubação:** Aerobiose (são aeróbios estritos), atmosfera húmida a 35 °C.
- A maioria das vezes as colónias só se tornam visíveis ao fim de 3 a 5 dias; inicialmente são pequenas, brilhantes, fazendo lembrar gotículas de mercúrio.

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO

- A identificação presuntiva é baseada na morfologia bacteriana coradas pelo método de Gram e pelo aspecto das colónias.
- As espécies são todas **catalase positiva**.
- A identificação da *B. bronchiseptica* faz-se por testes bioquímicos, eventualmente comerciais (ex.: Api 20 E®, GNI-Vitek®). (Quadro 2)
- A **identificação definitiva é serológica** utilizando um antisoro específico aplicado ao microrganismo em cultura pura.

QUADRO 2

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Crescimento em gelose sangue	-	+	+
Crescimento em MacConkey	-	v	+
Oxidase	+	-	+
Urease	-	+ (24h)	+ (4h)
Redução dos nitratos	-	-	+
Motilidade a 37°C	-	-	+

+ reacção positiva - reacção negativa v - reacção variável

GÉNERO *PASTEURELLA*

O género *Pasteurella* é um dos géneros pertencentes à família Pasteurellaceae. Todos os membros do género *Pasteurella* têm certas características fenotípicas em comum.

São **bacilos ou cocobacilos Gram negativo, anaeróbios facultativos e imóveis**. A maior parte das espécies é **oxidase POSITIVA, catalase POSITIVA**, fermenta a glicose e reduz os nitratos a nitritos.

Pasteurella multocida

1. HABITAT

A maior parte das espécies de *Pasteurella* faz parte da flora comensal de alguns animais selvagens e domésticos. É transmitida ao Homem por contacto próximo ou por mordedura destes animais. Pode ainda colonizar o aparelho respiratório superior de quem possui animais domésticos.

2. Significado CLÍNICO

A maior parte das espécies, pode ser considerada como patogénica oportunista. A *Pasteurella multocida* é a espécie mais frequentemente isolada. Em doentes imunodeprimidos também pode ser responsável por infecções do aparelho respiratório e do S.N.C., entre outras.

3. IDENTIFICAÇÃO

3.1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram negativo, rectos e tipicamente curtos.

3.2. Exame CULTURAL

Meios de cultura - **Gelose sangue**
Gelose de Chocolate

Incubação: Aerobiose, suplementada com 5% CO₂ a 35° C num mínimo de 24 horas.

- Morfologicamente, as colónias em gelose sangue são convexas, lisas, cinzentas, não hemolíticas mas por vezes há variantes rugosas e mucóides.

3.3. Testes de IDENTIFICAÇÃO

Testes que permitem diagnóstico presuntivo:

- **Oxidase positiva**
- **Catalase positiva**
- **Redução de nitratos a nitritos**
- **Indol positivo**
- **Urease negativa**

Testes confirmatórios:

- Testes bioquímicos (geralmente comercializados)

IDENTIFICAÇÃO das *ENTEROBACTERIÁCEAE*

1. INTRODUÇÃO

As bactérias da família das *Enterobacteriaceae* são agentes comuns de infecção no Homem. Estas estirpes bacterianas são das mais frequentemente isoladas no Laboratório de Microbiologia, do ambiente ou colonizadores de outros animais.

Todos os membros das *Enterobacteriaceae* são:

- **Bacilos Gram negativo**
- **Oxidase NEGATIVA**
- **Fermentam a glicose**
- **Crescem em gelose de MacConkey**
- A maior parte também **reduz os nitratos a nitritos**

Habitat natural

- As *Enterobacteriaceae* habitam numa grande variedade de locais que incluem o aparelho gastro intestinal humano, o de outros animais e vários locais do meio ambiente.

3. Significado CLÍNICO

GÉNEROS e ESPÉCIES de *ENTEROBACTERIACEAE* que NÃO ESTÃO habitualmente associadas a INFEÇÕES HUMANAS

<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Leminorella grimontii</i>
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Leminorella richardii</i>
<i>Citrobacter farme i</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>
<i>Citrobacter younge</i>	<i>Morganella morganni subsp.siboni</i>
<i>Obesumbacterium spp.</i>	
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Pantoea dispersa</i>
<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Pragia fontium</i>
<i>Citrobacter sedlakii</i>	<i>Proteus myxofaciens</i>
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Providencia rustigianii</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Providencia heimbachae</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Rahnela aquatilis</i>
<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Enterobacter dissolvens</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Erwinia spp.</i>	<i>Serratia entomophila</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Serratia proteamaculans subsp. quinov</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Tatumella pytseos</i>
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Trabulsiella spp.</i>
<i>Escherichia blattae</i>	<i>Xenorhabdus spp.</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Yersinia rohdei</i>
<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Yersinia aldovae</i>
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>
<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Yersinia mollaretii</i>
<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Yokenella regensburgei</i>

**GÉNERO e ESPÉCIES de ENTEROBACTERIACEAE que normalmente colonizam o
HOMEM e PODEM estar associadas a INFECÇÕES HUMANAS**

Citrobacter freundii
Citrobacter (diversus) koseri
Citrobacter amalonaticus
Edwardsiella tarda
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Enterobacter agglomerans group (Pantoea agglomerans)
Enterobacter gergoviae
Enterobacter sakazakii
Enterobacter amnigenus
Enterobacter taylorae
Escherichia coli
Hafnia alvei
Klebsiella pneumoniae
Klebsiella oxytoca
Klebsiella ozaenae
Morganella morgani

Proteus mirabilis
Proteus vulgaris
Proteus penneri
Providencia retgeri
Providencia stuarti
Salmonella (todos os serotipos)
Serratia marcescens
Serratia liquefaciens (grupo)
Shigella dysenteriae (grupo A)
Shigella flexeneri (grupo B)
Shigella boydii (grupo C)
Shigella sonnei (grupo D)
Yersinia pestis
Yersinia enterocolitica
Yersinia frederiksenii
Yersinia intermedia
Yersinia pseudotuberculosis

- Alguns são agentes de **zoonoses**.
- As espécies que colonizam normalmente o Homem podem provocar infecções endógenas.
- Estes microrganismos são frequentemente agentes de **infecção nosocomial**.
- As espécies ***Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, e *Yersinia enterocolitica*** são sempre agentes patogénicos do aparelho gastrointestinal.

As *Enterobacteriaceae* clinicamente relevantes podem ser consideradas em 2 grupos:

- **Bactérias patogénicas oportunistas** (os mais comuns)
 - *E. coli*.
 - *Klebsiella spp.*
 - *Proteus spp.*
 - *Enterobacter spp.*
 - *Serratia spp.*
 - *Citrobacter spp.*
- **Bactérias patogénicas obrigatórias**
 - *Salmonella spp*
 - *Shigella spp.*
 - *Yersinia pestis, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis*

EPIDEMIOLOGIA das *Enterobacteriaceae* CLINICAMENTE SIGNIFICATIVAS

MICROORGANISMO	HABITAT	TRANSMISSÃO
<i>Escherichia coli</i>	Flora normal do intestino humano e de outros animais; também pode habitar o aparelho genital feminino	Nas infecções não gastrointestinais os microrganismos podem ser endógenos ou transmitidos de pessoa a pessoa, especialmente no hospital; nas infecções gastrointestinais , a transmissão varia com o tipo de <i>E. coli</i> , e pode ser transmissão fecal-oral entre humanos através de ingestão de alimentos ou água contaminados, carne mal cozinhada ou leite de gado colonizado.
<i>Shigella spp</i>	Só se encontra em humanos na altura da infecção; não faz parte da flora normal do intestino	De pessoa a pessoa por via fecal-oral, especialmente em áreas sobrecarregadas e áreas com más condições sanitárias

MICROORGANISMO	HABITAT	TRANSMISSÃO
<i>Salmonella typhi</i> e <i>paratyphi</i>	Só se encontra em humanos mas não faz parte da flora normal do intestino	De pessoa a pessoa via fecal-oral por ingestão de comida ou água contaminadas com excrementos humanos
Outras Salmonella spp	Amplamente disseminadas na natureza e associadas a vários animais	Ingestão de alimentos contaminados derivados de animais, frequentemente aves domésticas, e também de laticínios. Pode ocorrer transmissão de pessoa a pessoa via fecal-oral em centros de prestação de cuidados de saúde quando as normas de lavagem das mãos não são respeitadas.
<i>Edwardsiella tarda</i>	Aparelho gastrointestinal de animais de sangue frio, tais como répteis	Incerto; provavelmente pela ingestão de água contaminada ou contacto directo com o animal transmissor
<i>Yersinia pestis</i>	Transmitida pelos ratos de cidade e domésticos e roedores selvagens	De roedores a humanos pela picada de pulga ou pela ingestão de tecidos de animais contaminados. Durante as epidemias humanas de doença pneumónica pode ser transmitido de pessoa a pessoa pela inalação de gotas de ar contaminadas; raramente transmitida pelo manuseamento ou inalação de tecidos ou fluidos contaminados
<i>Y. enterocolitica</i>	Cães, gatos, roedores, coelhos, porcos ovelhas. Não faz parte da flora normal humana	Ingestão de alimentos mal cozinhados (especialmente porco), produtos do dia, tais como leite e ingestão de água contaminada ou contacto com animais infectados
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Roedores, coelhos, veados e pássaros. Não fazem parte da flora humana normal	Ingestão do microrganismo durante o contacto com animais infectados ou comida ou água contaminadas
<i>Citrobacter spp</i>	Flora gastrointestinal normal	Endógena, ou pessoa a pessoa, especialmente em doentes hospitalizados.
<i>Enterobacter spp</i>		
<i>Klebsiella spp</i>		
<i>Morganella spp</i>		
<i>Proteus spp.</i>		
<i>Providencia spp.</i>		
<i>Serratia spp</i>		

4. EXAME LABORATORIAL

4.1. Exame DIRECTO

- Microscopicamente, estes microrganismos aparecem como **cocobacilos**, ou **bacilos rectos Gram negativo**, com extremidades arredondadas.
- A *Yersinia pestis* assemelha-se a um “alfinete de segurança” fechado, quando é corada com azul de metileno ou corante de Wayson; este é a chave característica para o diagnóstico rápido da peste.

4.2. Exame CULTURAL

Meios de Cultura

- **Gelose sangue**
- **Gelose chocolate**
- **MacConkey.**
- **Cled**

Nas coproculturas utilizam-se **meios selectivos**:

- Para pesquisa de *Salmonella* spp e *Shigella* spp - **Gelose Hektoen (HE)**, **gelose de xilose-lisina-desoxicolato (XLD)** e **gelose de Salmonella-Shigella (SS)**.

- Para a pesquisa de *Yersinia enterocolítica* - **Gelose CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina)**
- Para a pesquisa de *E.coli* O157:H7 - **Gelose MacConkey com sorbitol.**
- Incubação em atmosfera de aerobiose, 18 a 24 horas a 35° C.
- Os meios selectivos para *Yersinia* spp incubam a 25 a 30° C

4.3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO

- **Identificação bioquímica** com testes geralmente comercializados - qualquer sistema comercial de identificação pode ser utilizado para a identificação das *Enterobacteriaceae* e podem-se obter resultados dentro de 4 a 24 horas, consoante o sistema utilizado.
- Em alternativa à utilização dos testes comercializados, a maioria das Enterobacteriácias pode ser identificado presuntivamente utilizando um número reduzido de substractos:

1. **Kligler / T.S.I**
2. **Indol**
3. **Ureia**
4. **Citrato**
5. **Vermelho de metilo**
6. **Voges-Proskauer**

- Utilizam-se para identificar presuntivamente as Espécies patogénicas entéricas.
- **Identificação serológica do Género *Salmonella* spp**
 - Os antisoros polivalentes fornecidos comercialmente, designados como **A, B, C1, C2, D, E, F, G, H, I, e Vi**, são comumente usados para o grupo preliminar de *Salmonella* spp.
 - O antisoro **A** até **I** contêm anticorpos anti-antigénios somáticos ("O"), e o antisoro **Vi** é preparado contra o antigénio capsular ("K") da *Salmonella typhi*.
 - A serotipagem é feita usando um teste de aglutinação em lâmina. Se uma bactéria aglutina com o antisoro **Vi** e não reage com os do grupo "O", deve-se preparar uma suspensão salina do microrganismo, aquecida a 100°C por 10 minutos para inactivar o antigénio **Vi**. O microrganismo deve então ser retestado. A *Salmonella typhi* é positiva com o grupo **Vi** e grupo **D**.
- **Identificação serológica do Género *Shigella* spp**
 - O grupo serológico preliminar de *Shigella* spp também é executado usando anticorpos polivalentes somáticos "O", fornecidos comercialmente, designados como **A, B, C e D**. Assim como a *Salmonella* spp, também a *Shigella* pode produzir uma cápsula, e pode ser necessário aquecer, antes da serotipagem
 - A subtipagem de *Shigella* spp, nos grupos **A, B e C** (a *Shigella* grupo **D** só tem um serótipo) geralmente é feita em laboratórios de referência.

- **Identificação serológica da Espécie *E.coli* O 157**

- A ***E. coli* sorbitol negativa** pode ser serotipada, usando antisoro fornecido comercialmente, para determinar a presença dos antígenos somáticos “O” 157 e flagelar “H” 7.

BACILOS GRAM NEGATIVO NÃO FERMENTATIVOS

1. INTRODUÇÃO

- Grupo de bactérias aeróbias estritas não esporuladas que se desenvolvem rapidamente nos meios habituais de cultura e se caracterizam por **não produzirem energia pelo processo da fermentação**, ou seja, na fosforilação oxidativa, o aceitador final dos electrões é apenas o oxigénio.
- Representam cerca de **15% dos bacilos Gram negativo** isolados nos laboratórios de microbiologia, e destes, 75% são representados pela *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.
- A maioria destas espécies fazem parte do meio ambiente e causam infecções oportunistas.

2. PROCEDIMENTOS GERAIS de DESPISTE dos NÃO-FERMENTADORES

- Cheiro, pigmentação e morfologia das colónias
- Coloração de Gram
- Morfologia da bactéria e presença de esporos
- Motilidade e tipo de flagelos
- Modo de utilização da glicose
- Produção de sulfito de hidrogénio e presença de arginina-dihidrolase (ADH)
- Produção de OXIDASE
- Crescimento a 42°C
- Oxidação da glicose, xilose, lactose e maltose em meio oxidativo-fermentativo (OF) ou meio de Hugh-Leifson

GÉNERO *PSEUDOMONAS*, *BURKHOLDERIA* e outros semelhantes

Nomenclatura actual

Nomenclatura prévia

<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Pseudomonas mallei</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Pseudomonas gladioli</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp. CDC gr. 1	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (inclui CDC gr. Vb-3)	
“ <i>Pseudomonas denitrificans</i> ”	
<i>Pseudomonas-like</i> gr. 2	
CDC grupo Ic	
<i>Ralstonia picketti</i>	<i>Pseudomonas picketti</i> e <i>Burkholderia picketti</i>

1. DEFINIÇÃO

- Grupo de **bacilos Gram negativo, aeróbios estritos, oxidase positiva**, não fermentativos, móveis por 1 flagelo polar, que utilizam uma variedade de carboidratos, álcoois e aminoácidos como fontes de energia. São bacilos com 1 a 5 µm de comprimento e 0,5 a 1 µm de largura.
- São bactérias **mesofilicas**: têm uma temperatura óptima de crescimento entre 30 e 37°C, mas podem sobreviver a baixas temperatura (4°C), ou crescer a 42°C.

2. HABITAT

- A *Burkholderia* spp e *Ralstonia picketti* fazem parte do meio ambiente e não da flora humana habitual. A sua transmissão em meio hospitalar envolve contacto humano com equipamento médico contaminado. A *B. cepacia* é a mais frequente, tem como reservatório as plantas (p.ex.: cebolas), solo e água e pode sobreviver no material médico e desinfectantes.
- *B. pseudomallei* é o agente de uma infecção específica, a **meliodose**.
- As *Pseudomonas* são bactérias patogénicas oportunistas, responsáveis por infecções nosocomiais, sendo as mais frequentes: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*.

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- Crescem nos meios de cultura habituais como a **gelose sangue** e **MacConkey**, com **colónias não fermentadoras da lactose**, após incubação em aerobiose ou com 5% CO₂, bem como em caldos nutritivos (tioglicolato e BHI).
- Nos doentes com fibrose quística, deve ser efectuada a pesquisa de *B. cepacia* utilizando um meio selectivo (p.ex.: **OFBBL** - oxidativo fermentativo polimixina bacitracina lactose). Pode requerer incubação até às 96 horas.
- A maioria dos sistemas comercializados identifica correctamente a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Burkholderia cepacia*, mas para os outros microrganismos, não é tão fiável.
- A identificação da *P. aeruginosa* baseia-se nos seguintes testes preliminares:
 - **Oxidase POSITIVA**
 - **Bom crescimento a 42°C**
 - **Produção de pigmento azul-esverdeado** (piocianina), ou **vermelho acastanhado** (piorubina), difusível em meio incolor (ex: gelose simples, meio Mueller-Hinton).
- A *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida* fazem parte do grupo das *Pseudomonas* pigmentadas, mas apenas a primeira cresce a 42°C. As estirpes mucóides de *P. aeruginosa* podem reagir mais lentamente nos testes bioquímicos e impedir a sua correcta identificação pelos sistemas comercializados. Deve-se **suspeitar de *B. cepacia*** quando se encontra uma bactéria não fermentativa que descarboxila a lisina (80%). A identificação correcta das estirpes lisina-negativo (20%) ou oxidase negativo (15%) requer a execução completa dos testes bioquímicos.

MICROORGANISMO	HABITAT	TRANSMISSÃO	DOENÇAS e INFEÇÕES
Burkholderia cepacia	Solo, água, plantas, meio hospitalar. Não faz parte da flora humana; pode colonizar aparelho resp. em doentes com fibrose quística	Exposição a material contaminado, transmissão pessoa a pessoa	Infeções graves em doentes com fibrose quística ou doenças granulomatosas crónicas
Burkholderia pseudomallei (bacilo de Withmore)	Solo. Não faz parte da flora humana. Áreas do Sudoeste asiático	Inalação ou inoculação directa a partir da pele ou mucosas	Agente da Melioidose , com formas leves a formas fatais por sepsis
Burkholderia mallei	Não faz parte da flora humana Agente de doença em equídeos e macacos	Transmissão a humanos rara. Contacto com animais e penetração pela pele ou mucosas	Infeções humanas raras, desde inf. agudas ou crónicas da pele até sepsis.
Burkholderia gladioli	Meio ambiente. Causa doenças em plantas Não faz parte da flora humana pode colonizar ap. resp. doentes com fibrose quística	Transmissão a humanos rara. Modo de transmissão desconhecido	Idem
Ralstonia picketti	Meio ambiente	Modo de transmissão desconhecido; envolve exposição a material médico contaminado.	Infeções humanas raras. Pode ser isolada no sangue, urina ou expectoração: suspeitar de contaminação
Pseudomonas aeruginosa	Meio ambiente, sobrevive em tubagens e canalizações domésticas, piscinas, soluções de lentes de contacto e meio hospitalar. Raramente faz parte da flora humana	Ingestão de alimentos ou água contaminada; exposição a material e soluções contaminadas; transmissão pessoa a pessoa.	Patógeno oportunista pode causar <i>infeções comunitárias</i> (foliculite, otite externa, osteomielite pós traumática, endocardite e inf. respiratórias) ou <i>nosocomiais</i> (aparelho respiratório, urinário, feridas, bacteriémia e SNC)
Pseudomonas fluorescens, putida, stutzeri	Meio ambiente (solo, água) Não faz parte da flora humana	Exposição a material e soluções contaminadas	Infeções humanas raras. Pode ser isolada no sangue, urina ou expectoração: suspeitar de contaminação
P. mendocina alcaligenes, pseudoalcaligenes, CDC gr 1, "P. denitificans", Pseudomonas-like gr. 2, CDC gr. 1c	Meio ambiente Não faz parte da flora humana	Desconhecido. Rara em humanos	Não causam infeções no Homem
Brevindomonas vesicularis e diminuta	Meio ambiente Não faz parte da flora humana	Desconhecido. Rara em humanos	Infeções humanas raras. <i>B. vesicularis</i> é causa rara de bacteriémia

GÉNEROS ACINETOBACTER, STENOTROPHOMONAS, FLAVIMONAS e CHRYSSEOMONAS spp.

Nomenclatura actual

Nomenclatura prévia

<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas luteola</i> , CDC grupo Ve-1
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> , CDC grupo Ve-2
<i>Acinetobacter</i> spp; Sacarolítico, não-hemolítico.....	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>A .calcoaceticus</i> , <i>A . anitratus</i> , <i>A . calcoaceticus</i> subsp. <i>anitratus</i>
<i>Acinetobacter</i> spp; sacarolítico, hemolítico.....	<i>Acinetobacter alcaligenes</i> , <i>A .anitratus</i> , <i>A . haemolyticus</i>
<i>Acinetobacter</i> spp; assacarolítico, não-hemolítico.....	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> subsp. <i>Lwoffii</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>A . junii</i> , <i>A . lwoffii</i>
<i>Acinetobacter</i> spp; assacarolítico, hemolítico	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i> , <i>P. maltophilia</i> CDC grupo NO-1

1. DEFINIÇÃO

- São **cocobacilos Gram negativo, oxidase NEGATIVA** que **oxidam a glicose ou não a utilizam**, ao contrário das *Enterobacteriaceae* que a fermentam.
- Nenhum deles faz parte da flora saprófita humana mas devido a uma alta prevalência de *Acinetobacter* spp. e *S. maltophilia* no meio hospitalar, estas espécies podem colonizar a pele e o aparelho respiratório de doentes hospitalizados em UCI, em unidades de queimados, ou doentes debilitados, submetidos a manobras invasivas e sujeitos a antibioticoterapia sendo mais frequentemente isolados como colonizadores do que como agentes de infecção.

Microrganismo	Habitat	Transmissão	Tipo de Infecções
<i>Acinetobacter</i> spp	Meio ambiente e hospitalar Flora saprófita da pele e aparelho respiratório	Colonização de doentes hospitalizados; equipamento hospitalar (p. ex. cateteres i.v. ou urinários)	Geralmente isolado como agente colonizante. As verdadeiras infecções são nosocomiais (ITU, ap. respiratório, feridas, tecidos moles e bacteriémia)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Meio ambiente e equipamento hospitalar	Semelhante ao <i>Acinetobacter</i> spp	Agente de colonização de doentes internados. Infecções nosocomiais
<i>Chryseomonas luteola</i> <i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Meio ambiente e equipamento hospitalar	Incerta	Cateteres, bacteriémia e peritonite associada a diálise peritoneal contínua ambulatoria
CDC grupo NO-1	Orofaringe de animais	Mordedura ou arranhadura de animal	Infecções de ferida

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1 Exame DIRECTO

- Apresentam-se como **cocobacilos GRAM negativo**.

2.2 Exame CULTURAL

- **Crescem bem em meio de MacConkey, Gelose sangue e caldos nutritivos** (BHI e tioglicolato) após incubação a 35°C com ou sem CO₂.
- O *Acinetobacter* spp. e *S. maltophilia* podem ser facilmente identificados com os métodos bioquímicos comercializados.
- Dentro do grupo *Acinetobacter* spp, as estirpes dividem-se em :
 - Espécies sacarolíticas (oxidam a glicose) não-hemolíticas – ***A. baumannii***
 - Espécies assacarolíticas (não oxidam a glicose) não-hemolíticas – ***A. Iwoffii***
 - Espécies hemolíticas – ***A. haemolyticus***

GENERO *BRUCELLA*

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do género *Brucella* são responsáveis por uma infecção conhecida historicamente como febre ondulante, febre Mediterrânea, febre de Gibraltar ou febre de Malta. A Brucelose é uma **zoonose**, isto é uma doença que o Homem pode adquirir através do contacto directo com os animais infectados ou pela ingestão de produtos lácteos contaminados. A doença pode ainda ser contraída por inalação de aerossóis.

O género *Brucella* comporta seis espécies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. bovis* e *B. neotomae* das quais só as quatro primeiras espécies são responsáveis por doença no Homem. A *Brucella melitensis* é a espécie mais virulenta.

2. HABITAT

A *Brucella* pode infectar uma grande variedade de animais tais como gado caprino, gado ovino, gado bovino, etc. O microrganismo é transmitido entre os animais através do aparelho gastrointestinal, pele e membranas mucosas. Nalguns animais a bactéria pode proliferar no útero e glândulas mamárias.

3. SIGNIFICADO CLÍNICO

- A brucelose pode ser difícil de diagnosticar devido ao largo espectro de manifestações clínicas associadas. Na fase aguda da doença os sintomas mais frequentes são febre, suores nocturnos, arrepios, mialgias e artralguas. Linfadenopatias, esplenomegalia e hepatomegalia bem como manifestações cutâneas podem estar presentes.
- Na forma crónica e aguda, a brucelose pode originar complicações que atingem vários órgãos, nomeadamente o sistema nervoso central, aparelho respiratório, sistema esquelético, cardiovascular e pele.

4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

4.1. Exame DIRECTO

Apresentam-se como **cocobacilos GRAM negativo**, aeróbios estritos, imóveis, não capsulados e não esporulados.

4.2. Exame CULTURAL

Meios de cultura:

- **meio líquido de Triptose**
- **meio de Castanheda** ou outro meio de hemocultura que permita o crescimento desta bactéria
- **meio de Middlebrook 7H10.**

- Como a Brucella é um microrganismo de crescimento lento a incubação deve ser de 4 a 6 semanas a 35 ° C em atmosfera de aerobiose.
- Fazer passagens cegas semanalmente para gelose sangue e gelose chocolate.
- Incubar estes meios a 35° em atmosfera de 5% de CO₂. A *Brucella abortus* em cultura primária necessita de 5% de CO₂ para se desenvolver.

4.3. Testes de IDENTIFICAÇÃO

Os **métodos convencionais** para a identificação da Brucella incluem:

- Necessidade de atmosfera de 5% de CO₂ para o seu crescimento
- Produção de H₂S
- Produção de urease
- Crescimento na presença de corantes (Tionina, Tionina azul e Fucsina Básica)
- Catalase POSITIVA
- Oxidase POSITIVA

Testes serológicos - Confirmação serológica do género Brucella com antisoros monoclonais. Não permite a identificação da espécie.

Nota: *A Brucella é um microrganismo que só deve ser manipulado em Laboratórios do grupo IV.*

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS “EXIGENTES” “ Grupo HACEK ”

1. INTRODUÇÃO

- O termo «exigente» aplica-se tradicionalmente a microrganismos que **não se desenvolvem** ou **desenvolvem mal nos meios convencionais de cultura** (gelose sangue, gelose chocolate, MacConkey), **requerem atmosfera capnófila** ou **microaerófila** e podem exigir **incubação prolongada** para serem detectados.
- As suas exigências especiais de crescimento também dificultam a sua identificação bioquímica.
- **Nenhum dos sistemas de identificação comerciais identificam de forma fiável estes microrganismos.**
- O facto de serem considerados **agentes de infecção raros** pode reflectir, em parte, a dificuldade no seu isolamento e identificação.
- Em geral, fazem parte da flora microbiana normal do Homem e animais, e como tal a sua virulência é baixa, excepto se associados a infecção periodontal. Geralmente só causam doença no Homem quando introduzidos em tecidos ou locais estéreis, por exemplo após traumatismos tais como mordeduras ou manipulações da cavidade oral.

GÉNERO *ACTINOBACILLUS*

- Este género contém 6 espécies:
 - *Actinobacillus equuli*
 - *Actinobacillus ureae*
 - *Actinobacillus hominis*
 - *Actinobacillus lignieresii*
 - *Actinobacillus suis*
 - *Actinobacillus pleuropneumoniae* (espécie factor V dependente)
- A infecção humana está associada às 3 espécies que colonizam exclusivamente o homem: ***A. actinomycetemcomitans*, *A. ureae*, e *A. hominis*.**
- O *A. actinomycetemcomitans* já foi classificado neste género mas estudos recentes mostraram uma relação muito próxima com o *H. aphrophilus* e *H. segnis* (no entanto, em termos práticos, continua a ser tratado como uma espécie do género *Actinobacillus*).
- São **agentes indígenas habituais das mucosas dos aparelhos respiratório e genito-urinário** quer humano quer animal. A maioria das espécies são agentes patogénicos para os animais.

- O *A. actinomycetemcomitans* está associado a periodontite, endocardite e abscessos principalmente cerebrais. O *A. ureae* e *A. hominis* são bactérias oportunistas isoladas sobretudo na expectoração e secreções traqueais de doentes com doença respiratória crónica e pneumonia.
- As infeções humanas por *A. lignieresii* e *A. equuli* decorrem geralmente de mordeduras de animais, sendo o agente isolado quer da ferida quer do sangue.

1. Exame DIRECTO

Bacilos Gram negativo curtos (0,4-1 µm), dispostos isoladamente, aos pares ou em cadeia e tendem a exibir coloração bipolar.

2. Exame CULTURAL

- **Meio de Cultura** – gelose sangue e/ou chocolate. Não se desenvolve em MacConkey, ou tem um crescimento muito escasso.
- **Incubação** – em atmosfera húmida e suplementada com 5% de CO₂ ou em anaerobiose, durante 24-72h
- As culturas podem ser pleomórficas dando o aspecto de cultura não pura.
- As colónias de ***A. actinomycetemcomitans*** são acinzentadas, viscosas e aderentes ao meio; é muito típico o enrugamento no centro das colónias em forma de estrela.
- As colónias de ***A. ureae*** têm 0.5-1 mm de diâmetro, lisas, convexas, não hemolíticas, com ligeiro escurecimento da gelose por baixo das colónias.
- As colónias de ***A. hominis*** inicialmente têm 1-2 mm, transparentes, mas tornam-se brancas ou acinzentadas com o tempo.
- Nos meios líquidos forma grânulos que aderem às paredes do tubo ficando o caldo límpido.

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - ver Quadro

GÉNERO CAPNOCYTOPHAGA

- Este género contém 7 espécies:
 - *C. gengivalis*
 - *C. granulosa*
 - *C. haemolytica*
 - *C. ochracea*
 - *C. sputígena*
 - *C. canimorsus*
 - *C. cynodegmi*

- A *C. gengivalis*, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. ochracea* e *C. sputigena* fazem parte da flora oral humana, enquanto a *C. canimorsus* e *C. cynodegmi* colonizam a cavidade oral de cães e gatos.
- As espécies que colonizam o homem são **bactérias oportunistas** tendo sido implicadas em **doença periodontal, abscessos, queratites, osteomielite, endocardite**, etc.
- As espécies que colonizam os animais são responsáveis por infecções no Homem resultantes de mordeduras desses animais.

1. Exame DIRECTO

- **Bacilos Gram negativo fusiformes**, de 1-3 µm de comprimento, por vezes com a forma de lágrima, podendo ainda apresentar formas filamentosas ou cocóides.

2. Exame CULTURAL

- **Meio de Cultura** – gelose sangue e/ou chocolate. Não se desenvolve em MacConkey.
- **Incubação** – em atmosfera húmida e suplementada com 5% de CO₂ durante 24-72h
- As colónias às 24h são muito pequenas podendo atingir 2-3 mm de diâmetro às 48-72h de incubação.
- As colónias são convexas ou achatadas, com bordos irregulares («fingerlike»), não hemolíticas, podem apresentar «swarming» e podem corroer o meio de cultura. As colónias de *C. haemolytica* podem ser fracamente hemolíticas mas essa propriedade perde-se rapidamente nas subculturas. As colónias de *C. ochracea* têm cheiro a amêndoa amarga.
- As espécies animais (*C. canimorsus* e *C. cynodegmi*) distinguem-se das humanas por serem, sempre **catalase POSITIVA** e **oxidase POSITIVA**.

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - ver Quadro

GÉNERO *EIKENELLA*

- Este género pertence à família *Neisseriaceae*. Inicialmente classificada como *Bacteroides corrodens* mais tarde reclassificada como *Bacteroides ureolyticus* (estirpes anaeróbias estritas) e por fim ***Eikenella corrodens*** (estirpes microaerofílicas). Os microrganismos inicialmente classificados como HB1 são hoje reclassificados como *Eikenella corrodens*.
- É **comensal da flora oral humana** podendo ser responsável por infecções quer orais quer extra orais: pleuropulmonares, abscessos dos tecidos moles, artrite, meningite, endocardite, ferida cirúrgica, etc.

1. Exame DIRECTO

- **Bacilos Gram negativo finos e rectos**, de 1,5 a 4 µm de comprimento, com extremidades arredondadas, imóveis.

2. Exame CULTURAL

- **Meio de Cultura** – gelose sangue e/ou chocolate. Não se desenvolve em MacConkey.
- **Incubação** – em atmosfera suplementada com 5% de CO₂, durante 24-72h
- Demora 2-4 dias até se desenvolverem colónias bem visíveis. Inicialmente as colónias são transparentes mas com o tempo adquirem uma cor amarelada. Podem apresentar um cheiro semelhante ao *Haemophilus*.
- A maioria das estirpes **corroem o meio**, no entanto na mesma cultura podem aparecer colónias que corroem e outras não.

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - ver Quadro

GÉNERO *KINGELLA* e Grupo EF-4 do CDC

- Pertencem à família *Neisseriaceae*. A *Kingella* spp faz parte da flora do aparelho respiratório humano. A *K. kingae* é uma bactéria oportunista, podendo causar endocardite, osteomielite e sepsis. A *K. oralis* tem sido isolada na placa dentária mas o seu papel na doença periodontal é desconhecido. A *K. denitrificans* só muito raramente é isolada tendo sido associada a endocardite.
- As estirpes EF-4 fazem parte da flora oral de cães e gatos podendo provocar infecções humanas após mordeduras, arranhões e até contaminação de feridas preexistentes. O EF-4a está mais associado a cães enquanto o EF-4b está mais associado a gatos.

1. Exame DIRECTO

- **Cocobacilos Gram negativo** dispostos em pares ou cadeias curtas podendo ser confundidos com *Neisseria*, não esporulados, imóveis. Os microrganismos do grupo EF-4 também são cocobacilos Gram negativo mas dispostos isoladamente.

2. Exame CULTURAL

- **Meio de Cultura** – gelose sangue e/ou chocolate.
- **Incubação** – atmosfera de aerobiose, suplementada com 5% de CO₂. Tempo de incubação prolongado >48 horas.
- As colónias de *Kingella* são lisas e convexas com tendência para se espalharem e por vezes corroem o meio.
- A *K. kingae* produz **β-hemólise**.
- As colónias de EF-4 podem pigmentar fracamente de amarelo e cheiram a «pipocas».

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - ver Quadro

- A *K. kingae* diferencia-se das outras espécies porque acidifica a maltose, mas é uma reacção demorada.

- A *K. denitrificans* é a única espécie de *Kingella* que reduz os nitratos.
- As características fenotípicas do EF-4 são semelhantes à *Kingella* spp. mas a catalase é positiva e algumas estirpes crescem em MacConkey.

GÉNERO *CARDIOBACTERIUM* e *SUTONELLA*

- Os dois géneros são membros da família **Cardiobacteriaceae** (que inclui ainda o género *Dichelobacter* – agente patogénico veterinário) e fazem parte da flora habitual do aparelho respiratório e ocasionalmente do aparelho urogenital humanos.
- O género *Cardiobacterium* é constituído por uma única espécie, ***Cardiobacterium hominis*** e o género *Sutonella* também é constituído por uma única espécie, ***Sutonella indologenes*** (antes classificada como *K. indologenes*).
- O *C. hominis* tem sido associado a endocardite e *S. indologenes* a infecções oculares.

1. Exame DIRECTO

- O *C. hominis* apresenta-se como **bacilos Gram negativo pleomórficos** de 1-3 um de comprimento, com extremidades bulbosas, dispostos em roseta ou em cacho.
- *S. indologenes* são **bacilos Gram negativo** e, tal como a *Kingella* e *Cardiobacterium* resistentes à descoloração.

2. Exame CULTURAL

- **Meio de Cultura** – gelose sangue e/ou chocolate. Não se desenvolve em MacConkey.
- **Incubação** – Em atmosfera aeróbia, durante 24-72h
- Após dois dias de incubação observam-se pequenas **colónias circulares, achatadas, com tendência para se espalharem.**
- As colónias de *Cardiobacterium* são brancas ou amareladas, podem ter ligeira α -hemólise e corroer o meio, enquanto as de *Sutonella* são cinzentas e translúcidas.

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - ver Quadro

C. hominis é fosfatase alcalina negativo e acidifica a maltose, enquanto *S. indologenes* é fosfatase alcalina positivo e a acidificação da maltose é variável, geralmente negativa.

STREPTOBACILLUS MONILIFORMES

- Faz parte da flora da orofaringe e nasofaringe dos ratos (selvagens e de laboratório), as infecções humanas, geralmente, são consequência de mordeduras de rato ou do consumo de alimentos contaminados.

- Tem sido isolado no sangue , líquido sinovial e aspirados de abscessos.

1. Exame DIRECTO

- **Bacilo Gram negativo muito pleomórfico**, de 0,3-0,5 µm de largura e 1-5 µm de comprimento, mas podendo apresentar formas filamentosas de 100-150 µm.

2. Exame CULTURAL

- **Meio de Cultura** – Meios sólidos ou líquidos têm de ser suplementados com 10% de sangue de cavalo e 10% de extracto de levedura. (O SPS se presente em meio de hemocultura é inibidor deste género bacteriano).
- **Incubação** – Em atmosfera húmida e suplementada com 5% de CO₂, durante 24-72h.
- Após os três dias de incubação aparecem colónias de 1-2 mm de diâmetro, redondas, lisas, cinzentas, butirosas. Algumas colónias têm aspecto de «ovo estrelado» fazendo lembrar as de *Mycoplasma*.
- Nos meios líquidos desenvolvem-se sob a forma de «puff balls».

3. TESTES de IDENTIFICAÇÃO - ver Quadro

QUADRO de TESTES IDENTIFICAÇÃO

	<i>Actinobacillus</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Eikenella</i>	<i>Kingella</i>	EF-4a	EF-4b	<i>Cardiobacterium</i>	<i>Sutonella</i>	DF-3	<i>Streptobacillus</i>	<i>Chromobacterium</i>
Oxidase	+	V	+	+	+	+	+	+	-	-	V
Catalase	V	V	-	-	+	+	-	V	V	-	+
Desenvolvimento em MacConkey	V	-	-	-	V	V	-	V	-	-	+
Citrato Simmons	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	V
Redução dos nitratos	+	-	+	V	+	+	-	-	-	-	+
Dihidrolase da arginina	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	+
Urease	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
Indol	-	-	-	-	-	-	+	+	V	-	V
Manitol (acidificação)	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glicose (acidificação)	+	+	-	+	F	O	+	+	+	+	+

+ reacção positiva - reacção negativa V reacção variável F fermenta a glicose O oxida a glicose.

IDENTIFICAÇÃO das *VIBRIONACEAE*

Nome actual

Nome prévio

<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> biotipo2
<i>Vibrio cholerae</i>	
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	
<i>Vibrio damsela</i>	
<i>Vibrio fluvialis</i>	CDC grupo EF-6
<i>Vibrio furnissi</i>	
<i>Vibriohollisae</i>	CDC grupo EF-13
<i>Vibrio metschnikovii</i>	CDC grupo entérico 16
<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio cholerae</i> (sucrose negativo)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Pasteurella parahaemolyticus</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	CDC grupo EF-3
<i>Aeromonas caviae</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	
<i>Aeromonas jandaei</i>	
<i>Aeromonas schubertii</i>	
<i>Aeromonas sobria</i>	
<i>Aeromonas veronii</i>	
<i>Aeromonas shigelloides</i>	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	

1. INTRODUÇÃO

- Grupo de **bacilos Gram negativo, móveis por flagelo polar**. Sendo **aeróbios ou anaeróbios facultativos**, têm um metabolismo oxidofermentativo (a glicose é fermentada sem produção de gás), são **oxidase POSITIVA**, e crescem em meio de MacConkey.
- Não fazem parte da flora humana habitual, e a transmissão faz-se por ingestão de água contaminada, mariscos ou através de descontinuidade da pele e mucosas.
- Desta família fazem parte os **géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides* e *Chromobacterium violaceum***.

2. HABITAT e SIGNIFICADO CLÍNICO

MICROORGANISMO	HABITAT(reservatório)	TRANSMISSÃO	DOENÇA
<i>Vibrio cholerae</i>	Nicho fora do aparelho GI humano entre epidemias é incerto. Sobrevive em estado latente em águas marinhas. Portadores assintomáticos raros	Fecal-oral, ingestão de água contaminada, ou marisco contaminado	Cólera
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Água salgada	Água contaminada	Infecções feridas ou ouvido
<i>V. parahaemolyticus</i>	Água salgada	Ingestão água contaminada ou marisco	
<i>Aeromonas sp.</i>	Água salgada, água canalizada, piscinas	Ingestão alimentos ou água contaminada; exposição de pele ou mucosas; picada de anzóis	Gastroenterite, feridas e sepsis
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Água doce especialmente em clima quente	Ingestão água contaminada ou marisco	

3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- Para o diagnóstico da cólera, as amostras devem ser colhidas em **meio de Cary-Blair** e não meio de glicerol.

- **EXAME DIRECTO**

Na coloração de Gram, os vibriões apresentam-se como **bacilos Gram negativo**, curtos, geralmente isolados, em forma de vírgula.

- **EXAME CULTURAL** –

- **Meio TCBS** (tiosulfato citrato sais biliare sucrose)
 - **Meio de MacConkey**
 - **Meio SS**
 - Pode ser utilizada **água peptonada** (pH 8.4) como meio de enriquecimento, com incubação durante 5 a 8 horas a 35°C e subcultura para meio TCBS.
- Todas as espécies crescem bem em gelose sangue, gelose chocolate e meio de MacConkey, meio de caldo cérebro-coração e meio tioglicolato, a 35°C com ou sem CO₂ ao fim de 24 horas.

Morfologia das COLÓNIAS nos Meios de CULTURA

Microrganismo	Meio de cultura	Aparência das colónias
<i>Vibrio</i> spp	GS	Médias ou grandes, lisas, opacas com halo esverdeado.
	Mac	Lactose (-) , excepto <i>V. vulnificus</i> .
	TCBS	Amarelas ou verdes, consoante a espécie
<i>Aeromonas</i> spp.	GS	Grandes, redondas, opacas; beta-hemolíticas excepto <i>A. caviae</i> .
	Mac	Lactose (+) ou (-)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	GS	Brilhantes, opacas, lisas, não-hemolíticas.
	Mac	Lactose (+) ou (-)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	GS	Redondas, lisas, convexas algumas beta-hemolíticas; pretas ou violeta escuro; cheiro a amónia
	Mac	Lactose (-)

- As colónias destes microrganismos são semelhantes às *Enterobacteriaceae*, mas são **oxidase POSITIVA** (excepto *V. metschnikovii*).
- O principal problema na identificação do género ***Vibrio*** deve-se ao carácter **halofílico** da maioria das espécies e à ausência de concentrações suficientes de NaCl nos meios de cultura dos testes de identificação comercializados.

- Dividem-se em 2 grandes grupos:
 1. **Espécies halofílicas** - necessitam de meio salino para se desenvolverem: *V. parahaemolyticus*, *V. Alginolyticus*.
 2. **Espécies não-halofílicas** - não necessitam de meio salino: *V.cholerae*, *V.mimificus*, *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides*.
- As estirpes patogénicas de *Vibrio cholerae* pertencem ao serogrupo 01, que compreende 3 especificidades antigénicas (A,B,C) para os dois biotipos, *V. cholerae* (clássico) e El Tor. Os serotipos Ogawa e Inaba são os mais frequentes. As estirpes toxigénicas do serogrupo 01 são as que estão envolvidas nas epidemias.

3.2. Identificação BIOQUÍMICA – testes bioquímicos comercializados

MICROORGANISMO	Oxidase	D-glicose	Lactose	Sucrose	Myo.inositol	LDC	ADH	ODC	Cresc/ 0%NaCl	Cresc/ 6%NaCl	Cresc/ TCBS	Côr colónias TCBS
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Aeromonas caviae</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Aeromonas v. biovar sobria</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Aeromonas v. biovar veronii</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	V	-	-	V	NT	-	-	-	+	-	-	NT
<i>Vibrio cholerae</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	v	Bom	Amarelo
<i>Vibrio mimificus</i>	+	-	V	-	-	+	-	+	+	V	Bom	Verde
<i>Vibrio metschnikovii</i>	-	-	V	+	V	V	V	-	-	V	↓	Amarelo
<i>Vibrio vulnificus</i>	+	-	v	v	-	+	-	v	-	v	Bom	Verde
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	-	-	-	-	+	-	V	-	+	Bom	Amarelo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	Bom	Verde

+ : >90% espécies positivo - : > 90% espécies negativo V: variável NT- não testado

TESTE de SUSCEPTIBILIDADE aos ANTIMICROBIANOS

INTRODUÇÃO

- O **Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (AM)** deve realizar-se para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a susceptibilidade não puder ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo. Os testes de susceptibilidade estão principalmente indicados quando o microrganismo pertence a uma espécie capaz de exibir resistência aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados.
- Nos casos em que a infecção, apesar de provocada por um microrganismo cuja susceptibilidade a um determinado AM é devidamente reconhecida (ex.: susceptibilidade à Penicilina do *Streptococcus pyogenes*) e o doente é alérgico a esse AM, outros AM devem ser testados.
- Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos devem ainda ser efectuados em estudos epidemiológicos de resistência e em estudos de novos agentes antimicrobianos.
- Os vários tipos de testes de susceptibilidade disponíveis podem-se classificar em dois grandes grupos como mostra o esquema abaixo:

TESTES de DILUIÇÃO	Em meio LÍQUIDO	Macro
		Micro
	Em AGAR	
TESTE de Gradiente de difusão	E Teste ®	
TESTES de DIFUSÃO	Método de Kirby-Bauer	
	Método de Stokes	
	Método Comparativo	

Os testes de diluição, quer em meio líquido ou em agar, usam-se para medir quantitativamente a actividade “ in vitro “ de um AM numa estirpe bacteriana.

1. Teste de Macrodiluição em Meio Líquido

- Foi dos primeiros a ser desenvolvido e ainda é o **1º Método de Referência**.
- Utiliza diluições seriadas do antimicrobiano em caldo de Mueller-Hinton suplementado com catiões, que são distribuídas por 10 tubos. O tubo n.º 10 não tem AM e serve como controlo de crescimento.
- Inoculação de cada um dos tubos com uma suspensão bacteriana padronizada.
- Incubação a 35º C durante 18 horas.
- No final da incubação, os tubos são visualmente examinados para observação de turvação

- A turvação indica que o crescimento bacteriano não foi inibido pela concentração de AM contido naquele tubo.
- A mais baixa concentração de AM em $\mu\text{g} / \text{ml}$ que impede o crescimento bacteriano “in vitro” é a **Concentração Inibitória Mínima (CIM)**.

2. Teste de Microdiluição em Meio Líquido

- Adaptação do teste anterior a pequenos volumes.
- A susceptibilidade do microrganismo aos antimicrobianos é determinada em microplaca.
- As vantagens do método são o uso de pequenos volumes de reagentes, a possibilidade de testar grande número de bactérias contra um painel de AM e o baixo custo.

3. Teste de Diluição em Agar

- É o 2º método de referência.
- Adaptado ao uso em rotina em grandes laboratórios.
- Uma suspensão padronizada da bactéria é inoculada numa série de placas de gelose Mueller-Hinton, cada uma contendo uma diferente concentração de AM. As concentrações de AM utilizadas abrangem as concentrações terapêuticas da droga.
- O valor da CIM é estabelecida como sendo a da placa em que já não há crescimento bacteriano (“endpoint”).

4. Testes de Difusão

- Utilizam uma suspensão bacteriana padronizada que é semeada em meio sólido apropriado aos diferentes métodos utilizados.(ex.: gelose Mueller-Hinton para o Kirby Bauer)
- Colocação de discos de papel de filtro impregnados em antimicrobianos
- Medição dos halos de inibição de crescimento
- Resultados - **Sensível / Intermédio / Resistente**

5. ξ - Test

- Combina o princípio do método de difusão com disco (a preparação do inóculo é igual) com o do método de diluição (concentrações seriadas do AM impregnadas em tiras)

- Resultados em CIM. Os critérios utilizados para a interpretação da CIM são os utilizados pelos métodos de diluição e encontram-se nos documentos do NCCLS M7-A3 para bactérias aeróbias e M11-A3 para anaeróbias

6. Pesquisa de β lactamases (ver secção respectiva)

TESTE DE DIFUSÃO - Método de KIRBY-BAUER

1. DEFINIÇÃO

O método de difusão em agar é um dos mais utilizados na rotina dos Laboratórios de Microbiologia, para testar “in vitro”, a susceptibilidade aos antimicrobianos (AM) das bactérias de crescimento rápido e de alguns microrganismos exigentes.

O método actualmente recomendado pelo **NCCLS, Documento M2-A7** baseia-se no método originalmente descrito por Bauer e col. em 1966. Esta metodologia simples, mas bem controlada permite obter um resultado qualitativo que se baseia na relação dos “breakpoints” das CIM com os níveis terapêuticos dos antimicrobianos atingidos no sangue nas infecções sistémicas, ou ainda com níveis de AM concentrado na urina para aqueles utilizados apenas em infecções do aparelho urinário.

As tabelas de consenso do NCCLS são actualizadas anualmente num processo contínuo que se reflecte nos procedimentos, métodos e protocolos. Assim, **é imprescindível que os Laboratórios de Microbiologia que utilizem esta metodologia estejam actualizados com as novas edições ou suplementos das recomendações publicadas pelo NCCLS, para os testes de susceptibilidade aos AM.**

2. PRINCÍPIO

- Um **inóculo padronizado do microrganismo** é aplicado na superfície de uma placa de gelose Mueller-Hinton, onde se colocam discos impregnados de antimicrobianos.
- Após incubação, em geral durante 16-18 horas, são medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada disco.
- **O tamanho do halo é inversamente proporcional à CIM do microrganismo**, e baseando-se nas recomendações do NCCLS, é obtido um resultado qualitativo que se exprime em sensível, intermédio ou resistente.

3. INDICAÇÕES do MÉTODO

- Os testes de susceptibilidade estão indicados para qualquer microrganismo responsável por um processo infeccioso em que seja necessária a terapêutica antimicrobiana.

- Este método de difusão é utilizado para os seguintes microrganismos:
 - *Staphylococcus* spp.
 - *Enterococcus* spp.
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Streptococcus* spp.
 - *Enterobacteriaceae*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Acinetobacter* spp
 - *Neisseria gonorrhoeae*
 - *Haemophilus* spp.
 - *Vibrio cholerae*
- Excepto para os microrganismos em que, com a evolução microbiológica, o NCCLS vai criando recomendações e tabelas de consenso, o teste de difusão **não deve ser utilizado para testar a susceptibilidade noutros microrganismos de crescimento lento**, que requerem enriquecimento especial dos meios de cultura (ex.: *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp.).
- Devem ser utilizadas colónias isoladas do microrganismo em causa, obtidas a partir de uma cultura pura.
- Estão desaconselhados testes de susceptibilidade feitos directamente a partir do produto biológico.

4. SELECÇÃO dos ANTIMICROBIANOS para os TESTES DE ROTINA

- A selecção dos antimicrobianos a serem testados deve ser uma decisão de cada laboratório clínico em conformidade com a Comissão de Farmácia e Terapêutica e a Comissão de Controle de Infecção. A lista de antimicrobianos a testar por microrganismo, proposta nas **Tabela 1 e 1A do NCCLS** inclui agentes comprovadamente eficazes para o tratamento das infecções por eles provocadas e pode ser uma indicação dos AM a testar.
- Todos os antimicrobianos devem ser referidos utilizando os nomes genéricos e agrupados por classes farmacológicas.

5. REAGENTES e MATERIAL

5.1 Meios de Cultura sólidos

- **Gelose Mueller-Hinton (MH)**
 - **Gelose Mueller-Hinton com 5% sangue carneiro (MH5%SC)**
 - **Gelose GC com 1% suplemento**
 - **Gelose *Haemophilus* Test Medium (HTM)**
- O pH da Gelose MH deve ser de 7,2 a 7,4 e verificado sempre para cada lote do meio na altura em que está pronto a ser distribuído em placas. Também deve conter 10-30mg de íões livres de Mg⁺⁺/L e 50-60 mg de íões livres de Ca⁺⁺/L.

- Nas placas, o meio deve ter uma superfície plana e **altura uniforme de 4 mm**.
- Todas as placas devem ser conservadas a 4°C e as produzidas no Laboratório, devem ser utilizadas no prazo de uma semana.

5.2 Meios Líquidos para preparação do inóculo

- **Caldo de Mueller-Hinton (CMH)**
- **Caldo BHI**
- **Meio TSB**
- **Solução de NaCl a 0,85%**

5.3 Solução padrão de McFarland a 0,5 / Densitómetro

5.4 Discos de antibióticos com concentrações conhecidas (ver tabela)

- Os discos de **β -lactâmicos, carbapenemes, cefalosporinas e combinações com clavulanato** devem ser armazenados a -20°C por períodos longos, ou a 4°C por períodos mais curtos.
- Todos os outros, armazenar refrigerados a 4°C ou congelados. Devem ser retirados do frigorífico 1 a 2 horas antes de serem utilizados e deixados à temperatura ambiente antes de retirar da embalagem de conservação (com exsiccante) pois as gotas de condensação podem causar diminuição da actividade antimicrobiana ou da concentração de AM, levando a falsas resistências.
- Nunca utilizar discos fora de prazo.

5.5 Outro material

- Pinça esterilizada
- **Craveira ou régua**
- **Fonte luminosa regulável**
- **Superfície negra não reflectora**
- **Agitador de tubos (vórtex)**
- Estufa de 33-35°C

6. PROCEDIMENTO GERAL

Para os testes de susceptibilidade dos microrganismos de crescimento lento (*Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp. e *N. gonorrhoeae*), ver modificações especiais ao procedimento geral.

6.1. Temperatura

- Deixar as placas e os discos atingirem a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.

- As placas podem ser colocadas na estufa a 35°C entreabertas para evaporação das gotas de condensação na superfície do meio e na tampa, por períodos curtos para evitar a desidratação do meio (< 30 min).

6.2. Preparação do Inóculo

- Microrganismos provenientes de meios de conservação, congelados ou liofilizados devem ser subcultivados 2 vezes, antes de serem testados.

A - Método PADRÃO (de crescimento) ou de Fase Logarítmica (LFG)

Este é o método recomendado para os testes de susceptibilidade de microrganismos de crescimento rápido em placas de cultura com incubação > 24h.

- Retirar 4 a 5 colónias bem isoladas, morfológicamente semelhantes, de meio de cultura **selectivo ou não selectivo**. Tocando com a ansa no topo de cada colónia, transferir o inóculo para um tubo com 4 a 5 ml de **caldo de Mueller-Hinton** ou outro caldo nutritivo.
- Incubar este meio a 35°C (2 a 6 horas) até atingir ou exceder a turvação de 0,5 da escala de McFarland (contém 1 a 2 x 10⁸ CFU/ml).
- Ajustar à escala 0,5 com NaCl 0,85% ou caldo, visualmente ou com densitómetro.
- Agitar no vórtex durante 15-20 segundos para homogeneizar.

B - Método DIRECTO (suspensão de colónias)

Este é o método recomendado para os testes de susceptibilidade de:

- **Qualquer microrganismo proveniente de culturas de 18-24 horas**
- **Haemophilus spp, Neisseriae gonorrhoeae, e Streptococcus spp.**
- **Detecção da resistência à metilina nos Staphylococcus spp.**

- Retirar 4 a 5 colónias bem isoladas, morfológicamente semelhantes, de meio de cultura **não selectivo** e inocular em **NaCl 0,85 %**.
- Ajustar à escala 0,5 com NaCl 0,85%, visualmente ou com densitómetro.
- Agitar no vórtex durante 15-20 segundos para homogeneizar.

6.3. Inoculação das Placas

- Dentro de 15 minutos após a preparação do inóculo, rodar uma zaragatoa esterilizada na suspensão, e espremê-la contra as paredes do tubo acima do nível do líquido, para retirar o excesso de líquido.
- Aplicar a zaragatoa no meio de cultura, semeando em estrias apertadas em toda a superfície da placa, em 2 ou mais direcções, rodando cerca de 60 ° de cada vez, de modo a garantir a distribuição uniforme do inóculo. Por fim, rodar a zaragatoa na periferia da placa.
- Evitar embater com força a zaragatoa nos bordos da placa, para que não se formem aerossóis.

- Deixar secar as placas inoculadas 3-5 min, mas **não mais que 15 minutos**, antes de aplicar os discos.

6.4. Aplicação dos discos de Antimicrobianos

- Aplicar os discos na superfície da placa (distribuidor automático ou pinça esterilizada) com ligeira pressão de modo a assegurar o contacto completo com o agar.
- A distância entre discos (centro-centro) deve ser superior a 24 mm e cada um a 15 mm do bordo da placa:
 - Placas de 100 mm de diametro – máximo de 5 discos
 - Placas de 150 mm de diametro – máximo de 12 discos
- **Nunca recolocar** um disco em local diferente após contacto com a placa, porque o AM difunde imediatamente.
- Os meios de cultura com sangue contêm timidina, um antagonista do trimetoprim, sulfamidas e cotrimoxazol, pelo que estes AM não devem ser testados no meio de MH5%SC.

6.5. Incubação

- Inverter a placa e colocar em estufa a **35 °C, em aerobiose**, durante **16 a 18 horas** (não mais de 15 minutos após a aplicação dos discos).
- A atmosfera de CO₂ altera o pH da superfície e só deve utilizar-se para o *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e *Streptococcus* spp. (ver procedimentos especiais).
- **Não colocar mais que 5 placas sobrepostas na estufa.**
- Para o ***Staphylococcus* spp. incubar 24 horas o disco de oxacilina**, não ultrapassando a temperatura de 35° C.
- Do mesmo modo, para o ***Enterococcus* spp. incubar 24 horas o disco de vancomicina.**

6.6. Leitura das Placas

- Examinar as placas ao fim de 16 a 18 horas, e medir os halos de inibição se o crescimento for confluyente ou semi-confluyente. Se houver crescimento com colónias isoladas, repetir o teste.
- Nos meios transparentes (MH, HTM, GC 1%), os halos devem ser medidos em mm (régua ou craveira), com a placa fechada invertida debaixo de luz reflectida a um ângulo de 45°, sobre um fundo negro.
- ***Na leitura do disco de oxacilina nos Staphylococcus* spp., e do disco de vancomicina nos Enterococcus spp., observar cuidadosamente o halo de inibição com luz transmitida, segurando a placa entre a luz e o observador. **Qualquer crescimento dentro da zona de inibição é indicativo de resistência à meticilina ou à vancomicina, respectivamente.****

- Nos meios com sangue, retirar a tampa e medir os halos pela frente, com luz reflectida a um ângulo de 45°.
- Quando é testado um microrganismo hemolítico medir cuidadosamente o halo de inibição e ignorar a hemólise.
- Com excepção do disco de oxacilina nos *Staphylococcus* spp. e disco de vancomicina nos *Enterococcus* spp., ignorar a presença de pequenas colónias visíveis apenas com luz transmitida, ou com lupa.
- Ignorar a presença de “swarming” nas estirpes de *Proteus* spp..
- Na leitura dos halos de sulfamidas, trimetoprim ou cotrimoxazol, ignorar pequenas colónias em crescimento (“haze”), medindo o halo correspondente a 80% ou mais de inibição.
- Grandes colónias que crescem dentro do halo de inibição, podem representar cultura mista ou variantes resistentes. Devem ser repicadas, subcultivadas, identificadas e retestadas para TSA. Se os testes derem o mesmo resultado, ou na zona de resistência, dar como resistente.

7. PROCEDIMENTOS ESPECIAIS

7.1. HAEMOPHILUS SPP.

- O meio de cultura a utilizar sugerido pelo NCCLS é o **Haemophilus test medium (HTM)**
- Para o inóculo utilizar o **método directo da suspensão das colónias** a partir de uma placa de gelose chocolate com 18 a 24 horas de crescimento.
- Fazer uma suspensão em **caldo de MH** ou NaCl a 0,85% ajustada a 0,5 da escala de McFarland.
- Uma vez que este microrganismo produz grandes halos de inibição no meio HTM, devem ser aplicados menos discos (habitualmente 3).
- Incubar as placas a **35° C em atmosfera de 5% CO₂ durante 16 a 18 horas.**

7.2. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ou outros STREPTOCOCCUS spp.

- O meio de cultura a utilizar é o **Mueller-Hinton c/ 5% sangue carneiro (MH5%SC)**.
- Para o inóculo utilizar o **método directo da suspensão das colónias** a partir de uma placa de gelose sangue com 18 a 24 horas de crescimento.
- Fazer uma suspensão em **caldo de MH** ou NaCl a 0,85% ajustada a 0,5 da escala de McFarland.
- Incubar em **5% CO₂ durante 20-24 horas a 35°C.**

- A resistência à Penicilina de *Streptococcus viridans* deve ser feita determinando a CIM.

7.4. NEISSERIA GONORRHOEAE

- O meio de cultura a utilizar é a **Gelose GC suplementado a 1%** após autoclavagem.
- Para o inóculo, utilizar o **método directo da suspensão das colónias** a partir de uma placa de gelose chocolate com 18 a 24 horas de crescimento.
- Fazer uma suspensão em **caldo de MH** ajustada a 0,5 da escala de McFarland (contém 1 a 4 X 10⁸ CFU/ml)
- Incubar em **5 % CO₂ durante 20-24h a 35°C**.

7.5 NEISSERIA MENINGITIDIS

- Não há critérios padronizados para o método de difusão em agar (Kirby-Bauer)

7.6. MORAXELLA CATARRHALIS

- Fazer apenas a **pesquisa da β-lactamase pelo método da nitrocefina** - susceptibilidade extrapolada para ampicilina, penicilina e amoxicilina.
- Para os outros AM (cotrimoxazol, tetraciclina, eritromicina, amoxicilina+ác.clavulânico, cefuroxime, cefotaxime, e cloranfenicol) utilizar a Tabela 2 do NCCLS M2-A7.

8. CONTROLE DE QUALIDADE

- O controle de qualidade deve ser efectuado fazendo o antibiograma das estirpes padrão durante 30 dias consecutivos.
- Para cada antibiótico, se apenas 3 em 30 resultados estiverem fora dos limites de confiança, o CQ pode ser reduzido para semanal.
- Para um controle diário, apenas 1 em 20 resultados pode estar fora dos limites.
- Para um controle semanal, **todos** os resultados devem estar dentro dos limites.
- Quando houver resultados fora dos controles, efectuar acções correctivas.

ESTIRPE PADRÃO	Indicação	Observações
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Conjunto de discos para bacilos Gram negativo	Estirpe β-lactamase negativa
<i>E. coli</i> ATCC 35218	β-lactâmico+inibidor das β-lactamases	Estirpe β-lactamase positiva
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Conjunto de discos para cocos Gram positivo	Estirpe β-lactamase negativa

ESTIRPE PADRÃO	Indicação	Observações
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Aminoglicosídeos	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ou 33186	Cotrimoxazol Controle de aminoglicosídeos Alta Carga (AC)	Verifica as quantidades de timidina do agar
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	Conjunto de testes para <i>Haemophilus</i>	Utilizar com HTM
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	Algumas cefalosporinas	Utilizar com HTM
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	Controle de crescimento do HTM	Utilizar com HTM
<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Conjunto de testes para <i>N. gonorrhoeae</i>	
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Conjunto de testes para <i>S. pneumoniae</i> e outros <i>Streptococcus</i> spp.	Utilizar com MH 5 %SC

9. INTERPRETAÇÃO do TESTE

Desde que o Controle de Qualidade com as estirpes padrão esteja dentro dos limites de confiança - **Tabela 3 e 3A**, interpretar as zonas de inibição de acordo com as tabelas do NCCLS e descrever o microrganismo como sensível, intermédio ou resistente a cada AM testado.

- **SENSÍVEL** – o microrganismo responde à terapêutica com o AM utilizando a dosagem normalmente recomendada para aquele tipo de infecção e espécie bacteriana.
- **RESISTENTE** – é improvável uma boa resposta terapêutica às concentrações de AM atingidas com as dosagens habitualmente utilizadas com aquele AM e/ou está presente um mecanismo específico de resistência.
- **INTERMÉDIO** – a CIM do AM para o microrganismo é próxima do valor que ele pode atingir no sangue ou tecidos e para a qual a resposta clínica é inferior à de uma estirpe sensível. Implica clinicamente a sua utilização em locais onde a droga é concentrada fisiologicamente (urina) ou a utilização de altas doses do AM (β -lactâmico).

Tabela 2A – *Enterobacteriaceae*

Tabela 2B – *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*

Tabela 2C – *Staphylococcus* spp.

Tabela 2D – *Enterococcus* spp..

Tabela 2E – *Haemophilus* spp.

Tabela 2F – *Neisseria gonorrhoeae*

Tabela 2G – *Streptococcus pneumoniae*

Tabela 2H – Outros *Streptococcus* spp..

Tabela 2I – *Vibrio cholerae*

A leitura interpretativa do TSA pressupõe um conhecimento vasto sobre os antimicrobianos, incluindo a estrutura química, modo de acção, farmacodinâmica, farmacocinética, mecanismos de resistência e respectivos fenotipos, resistência intrínseca, e correlação dos resultados “in vitro” com a resposta clínica à terapêutica.

Algumas regras importantes (ver comentários nas tabelas respectivas) :

9.1. ENTEROBACTERIACEAE

- Nas estirpes de ***Salmonella e Shigella spp.*** isoladas nas fezes, só deve ser testada a ampicilina, uma quinolona e o cotrimoxazol. *Para as estirpes isoladas em infecções extra-intestinais, testar também o cloranfenicol e uma cefalosporina de 3ª geração. Não testar cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e aminoglicosídeos.* Os resultados para a *Salmonella spp.* não devem ser fornecidos aos clínicos nas gastroenterites sem gravidade.
- O **disco de ampicilina** é representativo da ampicilina e amoxicilina.
- O **disco de cefalotina** é representativo da cefalotina, cefapirina, cefradina, cefalexina, cefaclor e cefadroxil.
- A cefazolina, cefuroxime, cefpodoxime, cefprozil e loracarbef devem ser testadas individualmente.
- Nas estirpes isoladas no **LCR**, testar e informar o resultado para o **ceftriaxone ou cefotaxime**.

9.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA e ACINETOBACTER spp.

- O tamanho dos halos dos **aminoglicosídeos são dependentes** do pH e da constituição do meio, devido às variações catiónicas, pelo que a Tabela 2B só deve ser aplicada quando a estirpe de *P.aeruginosa* ATCC 27853 se encontra dentro dos limites aceitáveis.
- O cloranfenicol, cotrimoxazol e tetraciclina podem ser testados nas estirpes de *Acinetobacter*, mas não na *Pseudomonas aeruginosa*.

9.3. STAPHYLOCOCCUS spp.

- O **disco de oxacilina 1µg** deve ser utilizado para testar a susceptibilidade às penicilinas resistentes à penicilinase (metecilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina) por ser mais resistente à degradação do armazenamento e por detectar melhor as estirpes heteroresistentes.
- Os ***Staphylococcus metecilina-resistentes* (MRSA)** são resistentes “in vivo” a todos os betalactâmicos, associações betalactâmico+inibidor, cefalosporinas e carbapenemes, independentemente do resultado “in vitro” para estes AM. Um dado suspeito de estirpe MRSA é a presença frequente de multiresistência a outras classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, macrólidos, clindamicina e tetraciclina).
- Algumas estirpes de MRSA podem não ser detectados por este método – **fazer o teste de screening da oxacilina com MH c/ NaCl**.
- As estirpes resistentes à Penicilina são quase sempre produtoras de β-lactamase. Deve ser utilizado o disco de Penicilina 10 U, e os resultados são extrapoláveis para todas as

penicilinas sensíveis à penicilinase (ampicilina, amoxicilina, azlocilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina e ticarcilina)

- O cloranfenicol, macrólidos e clindamicina não devem ser referidos nos isolados da urina.

9.4. **ENTEROCOCCUS spp.**

- No CQ, pode ser utilizada a estirpe de ***S. aureus* ATCC 25923** para os AM referidos na tabela, excepto para o disco de Gentamicina (120µg) e de Estreptomicina (300µg), nos quais deve utilizar a estirpe de ***E. faecalis* ATCC 29212**:
 - Gentamicina - 16 a 22mm
 - Estreptomicina - 14 a 19mm
 - Cotrimoxazol (1.25/23.75µg)- ≥ 20 mm (testa o conteúdo em timidina do meio MH)
- O disco de ampicilina é representativo da ampicilina, amoxicilina e combinações com inibidores das betalactamases para as estirpes não produtoras de β -lactamase.
- O **disco de Vancomicina deve ser lido às 24 horas, utilizando luz transmitida** (ver procedimento geral - leitura das placas) e um resultado intermédio deve ser confirmado com a determinação da CIM.
- É recomendada a detecção da resistência à penicilina ou ampicilina exclusivamente pela **produção de β -lactamase pelo método da nitrocefina**.
- Não devem ser testados cefalosporinas, clindamicina, cotrimoxazol e aminoglicosídeos (excepto ALTA CARGA) devido a serem potencialmente erróneos.

9.5. **STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

- Deve ser utilizado o **disco de Oxacilina de 1µg** para detectar a resistência à Penicilina e não o disco de Penicilina (10 U):

Sensível - ≥ 20 mm (CIM $\leq 0,06\mu\text{g/ml}$)

Resistente - ≤ 19 mm

- **Este método não distingue a resistência intermédia (CIM entre 0,06-1µg/ml) da alta resistência (CIM $\geq 2 \mu\text{g/ml}$). Em estirpes com um halo \leq a 19 mm deve ser determinada a CIM da Penicilina e do Ceftriaxone ou Cefotaxime.**
- A resistência à Penicilina NÃO é por produção de β -lactamase por isso este teste não deve ser utilizado.
- O disco de Oxacilina é representativo para as Aminopenicilinas e Cefalosporinas orais (1ª e 2ª gerações). Se a estirpe for sensível à Penicilina é também sensível a todas as Cefalosporinas e Carbapenemes.
- A susceptibilidade ao Cefotaxime e Ceftriaxone deve ser feita pela determinação da CIM e não pelo método de difusão.

- Nas infecções graves (meningite, bacteriemia) deve ser determinada a CIM para a Penicilina, Cefotaxime ou Ceftriaxone bem como à Vancomicina.
- As estirpes sensíveis à Ofloxacina também são sensíveis à Levofloxacina.

9.6. STREPTOCOCCUS spp.

- Nos *Streptococcus viridans* isolados em hemoculturas e locais não estéreis (LCR) a susceptibilidade à Penicilina deve ser determinada pela CIM.

9.7. HAEMOPHILUS spp.

- Deve ser feita a **pesquisa da β -lactamase**, e as estirpes POSITIVAS devem ser dadas como resistentes à ampicilina e amoxicilina, independentemente do tamanho dos halos.
- As raras estirpes **resistentes à ampicilina β -lactamase NEGATIVAS** (alteração das PBP) devem ser consideradas resistentes às associações β -lactâmico+inibidor das β -lactamases, Cefaclor, Cefetamet, Cefonicid, Cefprozil, Cefuroxime, Loracarbef e Piperacilina/Tazobactam, independentemente dos resultados “in vitro” para estes agentes.
- Nas estirpes isoladas em **hemoculturas e LCR em infecções graves** (meningite, bacteriemia, epiglote, celulite, etc.) só deve ser dado o resultado da Ampicilina, Cefalosporina de 3ª geração e Cloranfenicol.
- O resultado dos AM administráveis por via oral só deve ser dado nas infecções localizadas pouco graves (sinusite, otite média não complicada, infecções broncopulmonares)

9.8. NEISSERIA GONORRHOEAE

- A detecção de resistência plasmídica à Penicilina deve ser feita pela pesquisa da **β -lactamase**, pelo método da nitrocefina.

10. LIMITAÇÕES da TÉCNICA

- Este método apenas está padronizado para bactérias de crescimento rápido e alguns microrganismos de crescimento exigente, referidos no início.
- Sempre que seja utilizado para os microrganismos sem método de difusão padronizado, os resultados devem ser dados como presumptivos, devendo isso ser referido no resultado final (p.ex.: *Eikenella* spp.)
- Alguns bacilos Gram negativo não fermentativos, crescem melhor a 30° que a 35°C, e podem dar halos de inibição anormalmente grandes a 35°C, originando falsas susceptibilidades. Este método só é válido para ***P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.**

- Em culturas > 24 horas, o n.º de microrganismos inviáveis aumenta, pelo que o inóculo feito pelo método directo ajustado a 0,5 da escala McFarland, contém menos de 1.5×10^8 CFU/ml.
- Existem numerosas **FONTES DE ERRO** que podem afectar os resultados:
 - Inóculo demasiado concentrado ou diluído.
 - Composição do meio de Mueller-Hinton: pH, conteúdo iónico em Mg^{++} e Ca^{++} (estes iões afectam a susceptibilidade da *P.aeruginosa* aos aminoglicosídeos) e conteúdo em timina e timidina.
 - Espessura do meio : se < 4 mm - aumento do diâmetro dos halos e vice-versa .
 - Perda da potência dos discos.
 - Pré incubação das placas > 15 minutos.
 - Pré-difusão das placas > 15 minutos.
 - Temperatura incorrecta da estufa de incubação e frigorífico.
 - Erros na leitura dos halos e erros de transcrição.

11. TESTE DE DESPISTE de RESISTÊNCIA à METICILINA do *Staphylococcus* spp. em meio sólido (Tabela M7-A5)

- O meio a utilizar é o **Mueller-Hinton c/ NaCl** (4%p/v ; 0,68 mol/L).
- A concentração de AM é de **6ug/ml Oxacilina** ou **10 ug/ml Meticilina**.
- Para o inóculo utilizar o método DIRECTO de suspensão das colónias (0,5 da escala de McFarland).
- Incubar a **35°C em aerobiose durante 24 horas**.
- **A presença de 1 colónia é sinónimo de RESISTÊNCIA.**
- Para o CQ utilizar as estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (susceptível) e de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente).

12. TESTE de DESPISTE da RESISTÊNCIA de ALTO NÍVEL AOS AMINOGLICOSÍDEOS nas estirpes de *Enterococcus* spp. pelo método de difusão em agar (Tabela M2-A7)

- O meio a utilizar é a **gelose Mueller-Hinton**.
- Os discos de AM a utilizar são: Gentamicina – 120ug e Streptomycin – 300ug
- Leitura dos halos – Tabela 2D

- Um resultado intermédio deve ser confirmado por outros testes (diluição em agar ou microdilução).

PESQUISA de β LACTAMASES

1. INTRODUÇÃO

- As β -lactamases são enzimas bacterianas heterogêneas que clivam o anel β -lactâmico das Penicilinas e Cefalosporinas para inactivar o AM.
- As β -lactamases são encontradas numa variedade de bactérias Gram positivo e Gram negativo.
- Os enzimas produzidos pelos *Staphylococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Enterococcus faecalis*, são clinicamente importantes.
- O significado dos enzimas produzidos pelas *Enterobacteriaceae* é menos claro e estas bactérias não devem ser testadas para pesquisa de β -lactamases. No entanto, o aparecimento das **β -lactamases de espectro estendido (ESBL)** nestas bactérias tem merecido especial atenção particularmente no que diz respeito aos seus mecanismos de resistência.
- Os processos mais usados nos laboratórios para pesquisar as β -lactamases são:
 1. Método da cefalosporina cromogénea
 2. Método acidimétrico
 3. Método iodométrico
- Todos estes testes são baseados na detecção visual dos produtos finais da hidrólise dos β -lactâmicos pela β -lactamase, os quais são detectados por reacção colorimétrica.

2. AMOSTRAS

- 4 a 5 colónias morfológicamente semelhantes de uma cultura pura e isoladas de **qualquer meio não selectivo**, com 18 a 24 horas de incubação.
- Alguns *Staphylococcus spp*. requerem indução, isto é uma prévia exposição a um agente β -lactâmico para aumentar a produção do enzima para níveis detectáveis. Neste caso, seleccionar colónias da periferia do halo de inibição do disco de 1 μ g de oxacilina.

3. Método da CEFALOSPORINA CROMOGÉNICA

3.1. Princípio

Discos de papel de filtro são impregnados com Cefinase (cefalosporina cromogénea). A β -lactamase hidrolisa a ligação amido do anel β -lactâmico e produz alteração de cor.

Este método é o preferido no uso clínico porque é fácil de realizar e detecta as mais conhecidas β -lactamases incluindo as dos *Enterococcus* spp, *Neisseria* spp e *Moraxella catarrhalis*.

3.2. Meios e Reagentes

- Discos / bastões de Cefinase (Nitrocefim®), guardados sempre em congelador (-20°C)
- H_2O destilada esterilizada
- Laminas de vidro
- Pipetas Pasteur esterilizadas
- Ansa

3.3. Procedimento (Cefinase em disco)

- Humedecer com H_2O destilada e esterilizada o disco de Nitrocefim previamente colocado na lâmina de vidro
- Usando uma ansa, remover 4 a 5 colónias morfológicamente semelhantes da cultura e depositar na superfície do disco.
- Verificar se há modificação da cor: resultados positivos aparecem 15 segundos a 5 min depois. Se não houver alteração de cor o teste é negativo

Nota: Algumas estirpes de *Staphylococcus* spp. podem dar reacções tardias (até 1 hora)

4. Método ACIDIMÉTRICO

4.1. Princípio

Pode ser realizado em tira ou disco de papel e em tubo e utiliza uma solução de vermelho de fenol. A solução ou o disco contém benzilpenicilina e um indicador de pH, normalmente o vermelho de fenol ou a púrpura de bromocresol.

A β -lactamase hidrolisa a benzilpenicilina e forma ácido penicilínico, causando uma descida do pH e uma consequente alteração da cor. Fácil de realizar mas não detecta todas as β -lactamases.

4.2. Meios e reagentes

- Disco ou tira acidimétrica
- Restante material igual ao do método anterior

4.3. Procedimento

- Igual ao do método anterior
- O resultado positivo ocorre dentro de 10 min. Se não houver alteração de cor aos 10 min, considerar o teste negativo

Nota: Algumas estirpes de *Staphylococcus* spp. podem dar reacções tardias.

O método acidimétrico em tubo e o método iodométrico não são descritos neste manual por não serem de execução fácil na prática diária laboratorial. O método iodométrico não é tão específico nem tão sensível como os métodos anteriores.

5. Procedimentos ESPECÍFICOS

β -lactamases nos *Staphylococcus* spp.:

- **A produção de β -lactamase pelos *Staphylococcus* spp. requer indução pela exposição destes à Penicilina. Se um teste é negativo à 1 hora em bactérias que não foram expostas a um agente indutor (β -lactâmico), não se pode concluir que o isolado não seja produtor de β -lactamase. Deve-se retestar a estirpe após a indução com um β -lactâmico.**
- A pesquisa das β -lactamases tem a vantagem de ter os resultados disponíveis muito mais precocemente que os testes de susceptibilidade convencionais.
- A produção de β -lactamase não é o único mecanismo de resistência aos β -lactâmicos (embora seja o mais frequente).
- Um teste de β -lactamase positivo indica resistência à Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina.
- Um teste de β -lactamase negativo não garante susceptibilidade a estes agentes, pelo que deverá ser efectuado um teste de susceptibilidade convencional.
- Os testes de microdiluição com CIM falham para detectar a produção de β -lactamases nalgumas estirpes que a produzem em pequenas quantidades. Um teste após indução é necessário nestas situações.

β -lactamases na *Moraxella catarrhalis*

As recomendações do NCCLS para os testes de rotina da *Moraxella catarrhalis* só incluem a realização de pesquisa de β -lactamase, uma vez que a incidência de resistências aos outros AM é muito baixa. Deve ser feita com **Nitrocefim®**

β -lactamases no *Haemophilus influenzae*

- Se a β -lactamase é negativa, recomenda-se o teste de susceptibilidade convencional à Ampicilina, porque há outros mecanismos de resistência (alterações das PBPs) principalmente se o *Haemophilus* é isolado de locais habitualmente estéreis (consultar testes de difusão com discos).

β -lactamases na *Neisseria gonorrhoeae*

Todas as estirpes devem ser testadas para pesquisa de β -lactamase com **Nitrocefim®**

β -lactamases no *Enterococcus faecalis*

- O método da **cefalosporina cromogénea** é o único método que mostrou ser eficaz na detecção de produção da β -lactamase pelo *Enterococcus faecalis* (não requer indução)

- Estirpes de *Enterococcus faecalis* produtores de β -lactamase geralmente parecem ser susceptíveis à Ampicilina e Penicilina pelos métodos convencionais de difusão em disco e CIM, mas devem ser dados como **Resistentes** a estes agentes se são produtores de β lactamase.

6. CONTROLO de QUALIDADE

- Estirpes padrão utilizadas
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - **positiva**
 - *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 - **negativa**
- Manter as culturas stock a – 70 °C até 3 anos ou até perderem a viabilidade. Subcultivar duas vezes antes de testar.
- Testar as estirpes de C.Q. sempre que se realiza o teste e em cada novo lote de reagentes.
- Registrar os resultados na folha de registo do C.Q. e determinar se os resultados são aceitáveis.

7. TESTES de DESPISTE e CONFIRMATÓRIOS da presença de β LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO (ESBL) em estirpes de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. Coli*

7.1. TESTES de DESPISTE

- O meio a utilizar é a **gelose Mueller-Hinton**.
- Discos de AM a utilizar (um ou mais dos seguintes):
 - Cefpodoxime (10ug)
 - Ceftazidima (30ug)
 - Aztreonam (30ug)
 - Cefotaxime (30ug)
 - Ceftriaxone (30ug)
- Para o inóculo, seguir os métodos recomendados no procedimento geral.
- Incubação a 35°C, em aerobiose , durante 16-18 horas.
- Se se obtiver um dos seguintes resultados → **presença de ESBL suspeita**.
 - Cefpodoxime \leq 22mm
 - Ceftazidima . \leq 22mm
 - Aztreonam \leq 27mm
 - Cefotaxime \leq 27mm
 - Ceftriaxone \leq 25mm

- Para o CQ, utilizar as estirpes ***E.coli* ATCC 25922** e ***K.pneumoniae* ATCC 700603**.
 - Cefpodoxime – 9 a 16mm
 - Ceftazidima - 10-18mm
 - Aztreonam - 9-17 mm
 - Cefotaxime – 17-25mm
 - Ceftriaxone – 16-24 mm

7.2. TESTES CONFIRMATÓRIOS

- O meio a utilizar é a **gelose Mueller-Hinton**.
- Discos de AM a utilizar:
 - Ceftazidima (30ug)
 - Ceftazidima/ác.clavulânico (30/10ug)
 - **e**
 - Cefotaxime (30ug)
 - Cefotaxime/ác.clavulânico (30/10ug)
- Para os testes confirmatórios utilizar os **discos de Cefotaxime e Ceftazidima isolados e em combinação com o Ácido clavulânico**
- Para o inóculo, seguir os métodos recomendados no procedimento geral.
- **Incubação a 35°C, em aerobiose , durante 16-18 horas.**
- Um aumento de 5 mm do halo de inibição para cada AM testado isolado e com o ácido clavulânico → **ESBL POSITIVO**
- Para o CQ, utilizar as estirpes:
 - ***E. coli* ATCC 25922** – aumento de 2 mm do halo de inibição para cada AM testado isolado e com o Ác.clavulânico
 - ***K. pneumoniae* ATCC 700603** - aumento de 5 mm do halo de inibição Ceftazidima e de 3 mm do halo de inibição do Cefotaxime

As estirpes de *Klebsiella* spp e *E. coli* produtoras de ESBL podem ser clinicamente resistentes ao tratamento com Penicilinas, Cefalosporinas e Aztreonam apesar da aparente susceptibilidade “in vitro”, por isso deve ser informada a resistência a todos estes agentes

Nota: Há outros métodos confirmatórios como, p. ex., a detecção do sinergismo entre Amoxicilina/Ácido Clavulânico com Cefotaxime, Ceftazidime ou Aztreonam.

TESTES DE DIFUSÃO

Microorganismo	AM a testar	Tabela de leitura	Inóculo	Meio de cultura	Temp.^a	Tempo de incubação	Atmosfera	Estirpes CONTROLE
<i>Staphylococcus spp</i>	Tabela 1	Tabela 2 C M2-A7	Directo	MH	30-35°C	16-18 horas 24 horas (oxacilina)	aerobiose	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> ATCC 35218
<i>Enterococcus spp.</i>	Tabela 1	Tabela 2 D M2-A7	Directo /LPG	MH	35°C	16-18 horas 24 Horas (vancomicina)	aerobiose	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Enterobacteriaceae</i>	Tabela 1	Tabela 2 A M2-A7	Directo /LPG	MH	35°C	16-18 horas	aerobiose	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 35218
<i>P. aeruginosa e Acinetobacter spp.</i>	Tabela 1	Tabela 2 B M2-A7	Directo /LPG	MH	35°C	16-18 horas	aerobiose	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>E.coli</i> ATCC 35218
<i>Haemophilus spp.</i>	Tabela 1 A	Tabela 2 E M2-A7	Directo	HTM	35°C	16-18 horas	5% CO ₂	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 <i>H. influenzae</i> ATCC 49766 <i>H. influenzae</i> ATCC 10211 <i>E. coli</i> ATCC 35218
<i>N. gonorrhoeae</i>	Tabela 1 A	Tabela 2 F	Directo	GC+1% suplemento	35°C	20-24h	5% CO ₂	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
<i>S. pneumoniae</i>	Tabela 1 A	Tabela 2 G M2-A7	Directo	MH5%SC	35°C	20-24h	5% CO ₂	<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619
<i>Streptococcus spp.</i>	Tabela 1 A	Tabela 2 H M2-A7	Directo	MH5%SC	35°C	20-24h	5% CO ₂	<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619
<i>V. cholerae</i>		Tabela 2I M2-A7	Directo /LPG	MH	35°C	16-18 horas	aerobiose	<i>E. coli</i> ATCC 25922

A QUALIDADE em MICROBIOLOGIA

(Q – Qualidade ; LM – Laboratório de Microbiologia)

A Qualidade consiste num espectro de actividades e processos que formam as características de um produto ou serviço, espectro esse que se divide em traços gerais, em 5 níveis:

1. **Qualidade total ou gestão total da Qualidade ou melhoria contínua da Qualidade** - abordagem de gestão que visa o sucesso a longo prazo através da satisfação do cliente, ou seja, uma forma de gestão que pretende, através da satisfação das necessidades do cliente atingir sucesso a longo prazo. Satisfação do cliente ao mais baixo custo.
 2. **Gestão da Qualidade** - consiste na coordenação e articulação dos vários elementos que dizem respeito à política de Qualidade, seus objectivos, responsabilidades, e meios de implementação tais como: planeamento da Qualidade, controlo da Qualidade, garantia da Qualidade, melhoria da Qualidade.
 3. **Sistema de Qualidade** - todo o conjunto de esforços para atingir os objectivos da Qualidade, i.e., a estrutura organizacional, recursos, processos e procedimentos necessários para assegurar a conformidade do produto ou serviço, sem desvios em relação a um referencial escolhido.
 4. **Garantia de Qualidade** - conjunto de actividades que demonstram que uma organização atingiu um nível aceitável de Qualidade.
 5. **Controlo de Qualidade** - técnicas operacionais para medir, comparar com objectivos, identificar erros ou problemas e respectivas medidas correctivas.
- Actualmente, a maioria dos serviços de saúde operam a nível do Controlo de Qualidade (nível 5) e da Garantia de Qualidade (nível 4).
 - Os serviços de saúde devem fazer um esforço para atingir, pelo menos, o **nível 3** (Sistema de Qualidade), particularmente se pretendem corresponder aos requisitos de Sistemas Acreditação ou Certificação os quais inevitavelmente, acabarão por se impor em todos os países europeus (por ex. Certificação segundo as Normas ISO 9000, Certificação segundo o King's Fund, Acreditação segundo a Norma NP 17025).
 - Para que uma organização como um hospital atinja os padrões de Qualidade desejados é necessária a participação activa de todo o seu pessoal. Num Hospital, as funções de cada grupo profissional têm que estar definidas na estrutura de gestão da Qualidade da Instituição (ver quadro n.º 1).
 - O conceito de Qualidade em Microbiologia deverá portanto ser encarado como parte do conceito mais vasto da Qualidade dos serviços de saúde. Assim cada LM deverá procurar implementar à sua escala um sistema de Qualidade.

Para implementar um **sistema de Qualidade em Microbiologia** é bom começar por definir especificamente nesta área três (3) termos muito utilizados:

- **Controlo de Qualidade (CQ)** - monitorização contínua das práticas de trabalho, do equipamento e dos reagentes. É o próprio pessoal que faz a avaliação dos resultados/dados. Também denominado *Controlo de Qualidade Interno*.

- **Avaliação de Qualidade (AQ) ou Avaliação do desempenho** - consiste na avaliação por terceiros, do desempenho do LM através da análise dos resultados obtidos em exames de material de controlo (amostras fictícias) realizados da forma e nas condições habituais de funcionamento do LM. Também denominado *Controlo de Qualidade Externo*, embora a avaliação do desempenho possa ter origem externa ou interna ao LM.
- **Garantia da Qualidade (GQ)** - é o processo total que garante a Qualidade dos resultados finais fornecidos pelo laboratório; compreende não só o controlo da fase analítica mas também das fases pré e pós analíticas do ciclo analítico. O controlo da fase analítica compreende tanto o CQ como a AQ.

FASE PRÉ-ANALÍTICA

1. Utilização RACIONAL do Laboratório de Microbiologia

- Para garantir a Qualidade dos seus serviços, o LM tem uma palavra a dizer na forma como é utilizado → utilização racional do LM.
- Assim, é indispensável existirem **recomendações** quanto à **adequação, número e frequência** dos **pedidos de exame microbiológico**. Tais recomendações devem ser estabelecidas por consenso entre os responsáveis dos serviços clínicos e os microbiologistas.
- Em laboratórios informatizados o próprio Programa informático pode ser concebido para fazer cumprir tais recomendações. Alguns exemplos:
 - Se recepcionada uma hemocultura isolada em 24 horas, automaticamente é emitida uma mensagem para o médico/serviço requisitante chamando a atenção para a necessidade de colher três (3) hemoculturas a fim de otimizar o diagnóstico de bacteriémia.
 - Se recepcionadas duas (2) ou mais uroculturas em dias consecutivos, automaticamente é emitida uma mensagem para o médico/serviço requisitante informando que as amostras redundantes só serão processadas depois de consultado o Microbiologista.
- No sentido de uma utilização racional o LM deve ainda, **recusar a requisição de exames microbiológicos que não permitem obter resultados clinicamente fiáveis**, como por exemplo:
 - Exsudados uretrais para diagnóstico de infecção urinária.
 - Exsudados vaginais para diagnóstico de endometrite.
 - Urina colhida por «jacto médio» para cultura de anaeróbios.
 - Expectoração para cultura de anaeróbios.
 - Exsudados nasofaríngeos para diagnóstico de otite média aguda ou sinusite.

2. COLHEITA e TRANSPORTE das AMOSTRAS

- A Qualidade dos resultados microbiológicos está directamente dependente da Qualidade e adequação das amostras recebidas, por isso amostras correctamente colhidas e transportadas ao laboratório são essenciais para a Qualidade dos resultados em Microbiologia.
- O LM é responsável pela **elaboração de normas de colheita e transporte das amostras**, bem como pela sua divulgação junto dos utilizadores (utentes, pessoal da saúde, serviços clínicos, etc.).
- Essas normas devem incluir, no mínimo, indicações sobre:
 - **Desinfecção do local da colheita**
 - **Método da colheita, tipo e volume de amostra**
 - **Recipientes a utilizar (esterilizados e com encerramento hermético)**
 - **Meios de transporte**
 - **Dados que devem constar na requisição** (ex.: data e hora da colheita, tipo de produto, se há presença de dispositivos invasivos, se o doente está a fazer terapêutica antibiótica, etc.)
- O LM também deve **monitorizar regularmente** se as amostras são transportadas dentro de um prazo razoável de tempo. Para isso é necessário saber a data e hora da colheita e a data e hora da recepção no LM (ver sondas de Qualidade - Quadro n.º 8).
- O LM deve, no mínimo, documentar a **data e hora da recepção da amostra** no laboratório.
- O LM deve poder garantir a informação que determinada amostra deu entrada no laboratório e em que ponto do processamento se encontra (*audit trail*).
- O LM deve ainda, estabelecer normas para **avaliação da qualidade das amostras** recebidas e deve recusar amostras cuja qualidade é duvidosa, não permitindo a obtenção de resultados fiáveis tais como : zangarões de material de lesões da boca, abscessos perianais, úlceras de decúbito ou lóquios, pontas de algália, pontas de drenos, tubos orotraqueais, etc.

3. Política de REJEIÇÃO de AMOSTRAS

- O LM deve estabelecer claramente uma **política de rejeição de amostras** cujo principal objectivo seja evitar a produção de resultados erróneos e garantir a segurança e saúde quer do pessoal que faz o transporte quer do pessoal do laboratório.
- O LM tem de estabelecer **critérios específicos de rejeição de amostras** e acções subsequentes, como por exemplo:
 - **Amostra não identificada** - não processar até resolução do problema. Chamar alguém do serviço requisitante para vir ao LM fazer a identificação.
 - **Discrepância entre a identificação da requisição e da amostra** - pedir ao médico/serviço requisitante para resolver o problema. Documentar o ocorrido no relatório de resultados.

- **Amostra em contentor visivelmente conspurcado** - avisar o médico/serviço requisitante. Não processar.
- **Amostra enviada em recipiente inadequado** - notificar o médico/serviço requisitante e se possível colher nova amostra. Só processar se não for possível nova colheita, documentar o problema no relatório de resultados.
- **Atraso excessivo entre a colheita e a recepção no LM** - notificar o médico/serviço requisitante e pedir nova colheita. Só processar se grave prejuízo para o doente, documentar o problema no relatório de resultados.
- **Volume insuficiente de amostra** para todos os testes solicitados - notificar o médico/serviço requisitante para que escolha os exames prioritários.

FASE PÓS ANALÍTICA

- O LM deve responsabilizar-se pela **entrega atempada dos resultados** ao médico/serviço requisitante.
- O LM deve estabelecer os **tempos de demora média** esperada para cada tipo de análises executadas. Embora idealmente o tempo de demora médio esperado deva ser estimado entre o momento da colheita e o momento em que o resultado é entregue ao médico/serviço requisitante, em termos práticos o LM apenas consegue garantir o tempo que decorre desde o momento em que a amostra é recepcionada no laboratório e o momento em que o respectivo resultado é emitido.
- Sempre que se detecta um erro depois do resultado ser emitido deve fazer-se um novo relatório de resultados corrigido mas sem apagar o erro original, i.e., o relatório corrigido deve referir claramente o erro ocorrido. As eventuais correcções com importância clínica relevante devem ser comunicadas de imediato ao médico/serviço prescritor.
- Sempre que se detecta algum erro, o LM deve proceder às modificações necessárias de políticas e/ou procedimentos para evitar a recorrência do erro.
- Idealmente o LM deve estabelecer uma política para a **comunicação o mais rápida possível de informação com particular relevância clínica** (por ex. resultados positivos de exames directos ou culturais de Líquor, presença de B.A.A.R. em amostras respiratórias, hemoculturas inequivocamente positivas, etc.), bem como proceder a uma monitorização apertada do tempo de demora médio na obtenção dessa mesma informação.
- Se a política do LM incluir a comunicação telefónica de determinada informação deve ficar documentado quem dá a informação, quem a recebe, data e hora da comunicação. A comunicação telefónica pode levar a mal-entendidos e por isso deve ser restringida apenas aos dados clinicamente relevantes e urgentes. **Toda a informação comunicada pelo telefone deverá ser considerada preliminar até à sua apresentação por escrito.**
- Os LM hospitalares devem periodicamente (no mínimo anualmente) disponibilizar os **resultados cumulativos dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos**, já que esta informação é de grande importância para a selecção racional das terapêuticas antimicrobianas empíricas, para desenvolver e actualizar o formulário de antimicrobianos do hospital e para analisar e prever as tendências de resistência nos microrganismos isolados.

FASE ANALÍTICA

- O controlo da fase analítica compreende tanto o **CQ (Controlo de Qualidade Interno)** como a **AQ (Avaliação da Qualidade ou Controlo de Qualidade Externo)**. O CQ e a AQ são actividades complementares e não podem ser usadas para se substituírem uma à outra.
- Devem aplicar-se Programas de Controlo de Qualidade quer internos quer externos que sejam práticos, realistas e económicos, independentemente da dimensão do laboratório. Cada laboratório deve desenvolver o seu próprio Programa de Qualidade, pois o tempo e recursos despendidos variam (na razão inversa) consoante o volume e o leque de análises realizadas no laboratório.
- Não é necessário monitorizar todos os reagentes e todas as técnicas todos os dias. A frequência da monitorização deve ser directamente proporcional à frequência dos erros detectados.
- Para ser bem sucedido o Programa de Qualidade deve ser supervisionado por um membro sénior da equipa técnica

1. CONTROLO de QUALIDADE INTERNO

O CQ interno reparte-se pelas seguintes áreas principais:

- **Manual de procedimentos**
- **Manutenção e controlo do equipamento**
- **Monitorização dos meios de cultura e reagentes** (corantes, antisoros, discos de identificação, discos de antibiograma, etc.).

Para um Programa eficaz de CQ é indispensável que o LM possa dispor de um conjunto mais ou menos extenso de estirpes microbianas de referência, reconhecidas internacionalmente, também chamadas «estirpes de colecção» (ATCC – *American Type Culture Collection*, NCTC – *National Collection of Type Cultures*) e que estão disponíveis em várias fontes comerciais.

Estas estirpes têm características e comportamentos bem definidos e conhecidos e por isso servem de referência ou controlo (ver quadros n.º 2 e 3).

1.1. **MANUAL de PROCEDIMENTOS (MP)**

- O MP é o documento mais importante para melhorar e manter a Qualidade de um serviço (é imprescindível para a Acreditação dos Laboratórios de Microbiologia Clínica). Deve conter toda a informação relevante sobre o funcionamento do LM.
- Embora o MP de outros laboratórios possa ser usado como guia, cada LM tem características específicas e portanto deve desenvolver o seu próprio MP. A utilização exclusiva da literatura inclusa nos *kits* comerciais não é recomendada embora a sua utilização como fonte de informação seja de encorajar.

- O MP para ser verdadeiramente útil tem que preencher 4 requisitos:
 1. **Ter carácter vinculativo** - deve ser elaborado por um ou mais membros seniores da equipa técnica, com reconhecida idoneidade e experiência prática na matéria e deve ser ratificado pela pessoa que tem a responsabilidade dos procedimentos em uso no LM.
 2. **Ser realista** - fazendo uma descrição clara, concisa e explicativa dos procedimentos (por exemplo, recorrendo a uma descrição por passos numerados), evitando ideais teóricos. Procedimentos complicados rapidamente deixam de ser respeitados e cumpridos. Um MP bem estruturado é aquele que permite a qualquer técnico de outro laboratório executar determinado exame apenas com recurso ao MP.
 3. **Estar actualizado** - formalmente o MP deve ser revisto anualmente; no entanto a revisão deve ser um processo contínuo sendo o MP actualizado sempre que necessário. Nenhum procedimento novo ou modificado deve entrar em uso até ser verificado pelo responsável do LM e oficialmente incorporado no MP. Todos os procedimentos originais e subseqüentes revisões e/ou modificações devem ser datadas, aprovadas e assinadas pelo responsável do LM. Todos os procedimentos que se tornaram obsoletos devem ser conservados por um período regulamentado por lei.
 4. **Estar disponível** - o MP deve estar facilmente acessível nas áreas de trabalho a todo o pessoal relevante. É da responsabilidade dos profissionais mais velhos e experientes garantir que o MP seja rigorosamente cumprido.
- O LM deve **conservar, por um período regulamentado por lei, os registos** suficientes para documentar todos os aspectos respeitantes às análises executadas sobre as amostras recepcionadas.

1.2. MANUTENÇÃO e CONTROLO dos EQUIPAMENTOS

- Junto de cada equipamento deve estar o seu manual de instruções com:
 - **Descrição do equipamento**
 - **Princípio de funcionamento e seu objectivo**
 - **Acessórios e reagentes** - necessários ao seu funcionamento
 - **Avarias /problemas mais frequentes e respectiva resolução**
 - **Procedimentos de C.Q. de rotina**
 - **Programa de manutenção**
- Cada LM deve estabelecer um Programa de manutenção e controlo de todos os equipamentos em uso. Esse Programa tem que ser documentado através de um registo concebido e adaptado a cada laboratório: por exemplo pode ir de simples fichas a um Programa informático (ver Quadro n.º 4).
- Actualmente, a microbiologia clínica utiliza cada vez mais equipamento complexo que exige um Programa de manutenção adequada a fim de evitar avarias e consequentes períodos em que não pode ser utilizado (*down time*).

- Os Programas de manutenção geralmente contemplam dois aspectos:
 - 1) **Manutenção de rotina** - tarefas necessárias, (incluindo a limpeza), para manter em funcionamento todos os elementos que constituem determinado equipamento. Tem que estar definida no Manual de procedimentos.
 - 2) **Manutenção periódica** - a sua frequência ou periodicidade é definida em função do tipo de equipamento e respectiva utilização. Os equipamentos mais utilizados exigem uma manutenção mais frequente do que aqueles usados raramente.
- Embora o pessoal do laboratório se possa encarregar da manutenção mais simples e deva ser responsabilizado por tarefas específicas da manutenção de rotina, as tarefas mais complicadas (manutenção periódica) são da responsabilidade dos Serviços de Instalação e Equipamentos (SIEs) ou da responsabilidade do próprio fabricante do equipamento, mediante um contrato de manutenção.
- Os custos dos contratos de manutenção devem ser pesados contra os custos de reparação, quase sempre mais caros, e contra as consequências dos tempos de imobilização do equipamento (*down time*).
- A manutenção do equipamento não deve ser encarada como um aspecto secundário da Qualidade. Uma vez definida (responsabilização, tarefas específicas e periodicidade) e treinado o pessoal, o Programa deve ser regular e sem interrupções. Uma solução prática aconselhada é atribuir especificamente a um determinado técnico do laboratório a responsabilidade da manutenção, bom funcionamento de cada aparelho e respectiva documentação.
- Nos **equipamentos cuja temperatura é crítica**, esta deve ser controlada com termómetros calibrados. Os limites de tolerância geralmente considerados aceitáveis são os seguintes:
 - **Estufas de incubação:** $\pm 2^{\circ}\text{c}$, excepto se uma dada temperatura específica é exigida.
 - **Banhos-maria e blocos de aquecimento:** $\pm 1^{\circ}\text{c}$.
 - **Frigoríficos:** 4 - 8 $^{\circ}\text{c}$
 - **Congeladores:** $\pm 5^{\circ}\text{c}$.
 - **Ultra congeladores:** $\pm 10^{\circ}\text{c}$, desde que abaixo de – 60 $^{\circ}\text{c}$.
- A limpeza das superfícies dos equipamentos deve seguir as instruções do fabricante, o qual recomenda por vezes, a sua própria solução de limpeza e descontaminação. Evitar as soluções de hipoclorito de sódio nas partes metálicas devido à sua acção corrosiva. As soluções mais indicadas são geralmente de álcool a 70%. O uso de toalhetes de papel embebidos na solução desinfectante indicada pode ser uma solução prática.
- Devem seguir-se todas as **recomendações de segurança** no que se refere ao equipamento, preconizadas no manual de segurança do laboratório.
- Leitura recomendada para informação mais detalhada sobre manutenção e controlo de equipamentos: capítulo n.º 12 de ***Clinical Microbiology Procedures Handbook*** – 1992, ASM.

1.3. MONITORIZAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

1.3.1. MEIOS de CULTURA

Dos meios de cultura (comercializados ou preparados no próprio LM) esperam-se as seguintes características:

Esterilidade
e
Propriedades nutritivas para permitir o desenvolvimento microbiano
e/ ou
Propriedades de selectividade ou inibição para determinados microrganismos
e/ou
Capacidade para manifestar uma resposta bioquímica apropriada.

Meios preparados no LM

Se os meios de cultura forem preparados no próprio laboratório a partir de materiais desidratados que têm de ser reconstituídos, aquecidos e por vezes suplementados com aditivos, é essencial controlar o efeito de cada um desses passos. Todos os lotes antes de serem utilizados, têm que ser testados quanto a:

1. Esterilidade do Meio (testes de esterilidade)

- Uma amostra representativa de cada novo lote é incubada 18-24h a 35-37°C, e mais 24h à temperatura ambiente (para excluir a contaminação com bactérias psicrófilas). Para lotes de 100 unidades ou menos, uma amostra representativa deve ser no mínimo de 5% das unidades; para lotes maiores 10 unidades escolhidas ao acaso é suficiente.
- A contaminação dos meios selectivos pode não ser detectada pelos testes habituais de esterilidade mas se forem dissolvidos alguns mililitros do produto final em 10 vezes o seu volume de caldo estéril (para diluir as substâncias inibidoras) detecta-se qualquer eventual contaminação.
- Se os testes de esterilidade mostrarem contaminação o respectivo lote não deve ser usado.
- As amostras usadas nos testes têm que ser descartadas não podendo ser reutilizadas (devido à desidratação).

2. Comportamento do Meio

- A capacidade para proporcionar o desenvolvimento microbiano ou exibir determinadas qualidades selectivas e/ou diferenciais é testada com o recurso a estirpes de controlo. Ver quadro n.º 5.
- Sempre que aplicável e possível, podem utilizar-se as estirpes descritas no quadro n.º 2 como estirpes controlo. No entanto, estirpes selvagens isoladas no próprio LM, depois de bem caracterizadas, de preferência em laboratório de referência, podem ser conservadas e utilizadas no CQ.

- As estirpes de controlo podem alterar as suas características quando são mantidas em subculturas sucessivas, é preferível manter as estirpes congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou liofilizadas.

2.1. Testes para a Capacidade de Desenvolvimento

- Semear os meios a testar com um inóculo leve e incubar nas mesmas condições em que vão ser utilizados por rotina.
- Para obter um inóculo leve, fazer uma suspensão da estirpe de controlo apropriada com densidade de 0.5 de McFarland; diluir esta suspensão de 1/10 ou 1/100 em caldo estéril ou soro fisiológico.
- Inocular os meios a testar com:
 - 1 microlitro - para a diluição de 1/10
 - 10 microlitros - para diluição de 1/100
- A inoculação nos meios sólidos pode fazer-se com ansa calibrada.

2.2. Testes para a Capacidade de Inibição ou Selectividade

- Os meios selectivos são concebidos não só para permitir o desenvolvimento de alguns microrganismos, mas também para inibir o crescimento de outros e por isso devem ser testados com 2 tipos de estirpes controlo, um cujo desenvolvimento é esperado e outro cuja inibição é esperada:
 - Inocular pelo menos um microrganismo para testar as características de desenvolvimento e um microrganismo para testar/confirmar as características inibitórias.
 - Para se demonstrar o efeito inibitório semear os meios a testar com um inóculo forte e incubar nas mesmas condições em que vão ser utilizados por rotina.
 - O inóculo utilizado deve ser forte: suspensão bacteriana com densidade de 0.5 de McFarland → Inocular os meios a testar com 10 microlitros.

2.3. Testes para a resposta Bioquímica (características fenotípicas)

- Para cada resposta esperada específica (por exemplo fermentação de hidratos de carbono, produção de SH_2 , produção de indol, etc.) tem que se inocular um microrganismo apropriado que produza a desejada reacção.
- Deve usar-se pelo menos um microrganismo como controlo positivo, que produz a reacção esperada e um microrganismo como controlo negativo, que não produz a reacção esperada.
- Os meios diferenciais (com indicadores bioquímicos) também são testados com 2 tipos de estirpes controlo: um que se sabe demonstrar resposta positiva e outro que se sabe demonstrar resposta negativa.
- Os laboratórios que preparam os seus próprios meios têm que arranjar uma forma prática mas segura para os rotular com indicação do **n.º de lote, data de preparação e data de validade** - expiração.

- Os contentores de meios desidratados usados no laboratório devem ter registada a sua data de abertura (a sua composição e prazo de validade geralmente já fazem parte do rótulo comercial).
- O prazo de validade dos meios preparados no próprio LM é variável e o LM deve informar-se disso, mas de um modo geral:

Os meios em placa duram cerca de:

- 15 dias - se conservados a 4°C
- 4-6 semanas - se conservados a 4°C, em sacos de plástico fechados

Os meios em tubo duram cerca de :

- 2 semanas - se conservados à temperatura ambiente
- 4 semanas - se conservados a 4°C, com rolhas «arejadas» (de algodão)
- 6 meses - se conservados a 4°C e fechados hermeticamente

Meios Comercializados prontos-a-usar:

- Actualmente, a maioria dos laboratórios usa meios de cultura comercializados cuja Qualidade é controlada pelo próprio fabricante ou entidade autorizada.
- O LM deve ter a documentação, fornecida pelo fabricante/vendedor comprovativa de que o meio de cultura adquirido (comprado) está conforme o protocolo de CQ recomendado pelas autoridades ou entidades de saúde de cada país. Esta documentação muitas vezes faz parte da bula.
- O utilizador não necessita de repetir o protocolo de CQ, excepto no que se refere à verificação se o meio não está desidratado, hemolisado, contaminado ou fracturado, ou ainda sempre que se verifique algum mau funcionamento de qualquer dos meios em utilização nas condições de rotina do laboratório. Nestes casos o CQ faz-se segundo um esquema idêntico ao descrito para os meios preparados no próprio laboratório

1.3.2. REAGENTES

- Todos os reagentes em uso, quer de origem comercial quer preparados no próprio laboratório, devem estar rotulados quanto à sua composição, data de preparação (ou abertura) e prazo de validade.
- Os reagentes de origem comercial devem ser conservados de acordo com as instruções do fabricante, descartados quando fora do prazo de validade, e sujeitos a CQ preconizado pelo fabricante.
- Todos os reagentes em uso, quer de origem comercial quer preparados no próprio laboratório, devem ser testados regularmente com pelo menos uma testemunha positiva e uma testemunha negativa; esta periodicidade é variável de acordo com cada reagente e deve ser estabelecida pelo Microbiologista responsável (Quadros n.º 6 e n.º 7).
- Os *kits* de identificação microbiana de origem comercial, são geralmente constituídos por uma colecção mais ou menos extensa de testes miniaturizados, pelo que o seu CQ tem que demonstrar que todos os testes estão a funcionar correctamente quer isoladamente quer no seu conjunto; assim é quase sempre necessário recorrer a várias estirpes de

controlo (e não apenas a uma testemunha positiva e outra negativa). As estirpes de controlo a utilizar devem ser indicadas pelo fabricante (muitas vezes são estirpes descritas no Quadro n.º 3).

- Leitura recomendada para informação mais detalhada sobre monitorização dos meios de cultura e reagentes: capítulo n.º 13 de ***Clinical Microbiology Procedures Handbook*** – 1992, ASM.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE (AQ)

Também denominada **avaliação da proficiência**, avaliação do desempenho ou controlo de Qualidade externo da Qualidade, embora a sua origem possa ser externa ao LM ou não. A Avaliação da Qualidade consiste na avaliação do desempenho do LM através da análise dos resultados obtidos/ emitidos nos exames de material de controlo, realizados da forma e nas condições habituais de funcionamento.

- Na prática, a **avaliação da Qualidade** consiste num sistema em que amostras de conteúdo conhecido mas não revelado, são introduzidas no laboratório para serem examinadas exactamente da mesma forma que são examinadas na prática habitual do laboratório as amostras semelhantes dos doentes/utentes. Os resultados obtidos são depois comparados com os resultados esperados e que não tinham sido revelados.
- Esta avaliação do desempenho pode ser Externa ou Interna:
 1. Na **Avaliação Externa** há uma **entidade externa** ao LM que regularmente envia as amostras controlo para serem examinadas e procede à avaliação dos resultados.
 2. Na **Avaliação Interna é o próprio LM** que cria amostras de controlo, por exemplo a partir de material biológico. Essas amostras são examinadas no próprio LM em tempos diferentes ou por técnicos diferentes, comparando-se depois a fiabilidade e reproductibilidade dos vários resultados obtidos, ou então essas amostras são enviadas para um laboratório de referência para posterior comparação dos resultados.
- Todos os LM devem estar envolvidos em Programas de avaliação da Qualidade de acordo com o respectivo grau de especialização (Bacteriologia geral, Micobacteriologia, Micologia, Parasitologia, Biologia molecular, etc.)
- Devido à sua complexidade e diversidade em relação às outras áreas da medicina laboratorial, torna-se muito difícil produzir materiais de controlo que abranjam todas as áreas da microbiologia; além disso existem várias dificuldades técnicas na preparação de amostras para a AQ (ex.: manter a viabilidade dos microrganismos, conseguir a uniformização de todas as amostras, conseguir a simulação de amostras reais, etc.) por isso, é quase sempre mais fácil e mais económico participar num Programa já em funcionamento (p.ex.: NEQAS) do que estar a criar o seu próprio Programa.

INDICADORES ou SONDAS de QUALIDADE

- Actualmente uma das formas mais recomendadas para avaliar a Qualidade global dos serviços de saúde, incluindo a Medicina Laboratorial é através da **comparação de indicadores de desempenho** com padrões/objectivos/especificações considerados desejáveis.
- Um indicador (também chamado sonda ou monitor) é uma variável mensurável relacionada com algum aspecto da prestação de cuidados (serviços).
- Devem escolher-se indicadores úteis, capazes de fazer a discriminação entre um sistema que está a funcionar bem e outro com deficiências.
- É importante compreender que os indicadores mais úteis podem requerer acesso a informação que não está facilmente disponível no laboratório por exemplo o processo clínico do doente/utente.
- No Quadro n.º 8 mostram-se alguns indicadores apropriados para a prática da microbiologia.

QUADRO n.º 1 - FUNÇÕES DO PESSOAL – Programa de GARANTIA de QUALIDADE

CARGO / ORGÃO	FUNÇÃO
Conselho de Administração	Liderar e apoiar o Programa de melhoria de Qualidade da Instituição.
Director do Laboratório (Serviço de Patologia Clínica)	Designar o pessoal e distribuir os recursos destinados às actividades do Programa de melhoria de Qualidade. Delinear os objectivos/metasp do Serviço, rever os procedimentos, interpretar os resultados do Programa externo de Qualidade. Fazer a ligação com as outras unidades funcionais da Instituição.
Director Clínico	Rever e aprovar as políticas e procedimentos necessários para se conseguir atingir as metas traçadas num Programa de melhoria de Qualidade.
Director / Responsável do LM	Implementar procedimentos e gerir a informação de acordo com os objectivos/metasp do Programa de Garantia de Qualidade. Providenciar junto do Director, recomendações para melhorar produtos e serviços.
Microbiologista e Técnicos de microbiologia	Participar na monitorização e avaliação dos serviços laboratoriais. Providenciar recomendações para melhorar produtos e serviços.

QUADRO n.º 2 - ESTIRPES PADRÃO indicadas para CONTROLO de ATMOSFERA DE INCUBAÇÃO

Tipo de Atmosfera	Estirpe controlo	Comentário
Atmosfera de CO₂ (5-10%)	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Pode utilizar-se uma estirpe CO ₂ dependente isolada no próprio LM
Atmosfera de microaerofilia (10% CO ₂ , 5% O ₂ e 85% de N ₂)	<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	
Atmosfera de anaerobiose (5% Hidrogénio, 10% CO ₂ e 85% de N ₂)	<i>Clostridium novyi A</i> ATCC 19402 <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	

**QUADRO n.º 3 - ESTIRPES-PADRÃO indicadas para os TESTES de SUSCEPTIBILIDADE
aos ANTIMICROBIANOS**

<u>MICROORGANISMO</u>	Método de diluição (NCCLS)	Método de difusão (NCCLS)	Método de difusão comparativo (Stokes)	Comentários
<i>S. aureus</i> (sensível aos AM habitualmente testados)	ATCC 29213 (produtora de β -lactamase)	ATCC 25923 NCTC 12981 (não produtora de β -lactamase)	NCTC 6571	ATCC 29213 pode ser usada como controlo positivo e a ATCC 25923 como controlo negativo nos testes de produção de β lactamase
<i>E. faecalis</i> (sensível aos AM habitualmente testados)	ATCC 29212	ATCC 29212 NCTC 12697	NCTC 12697	Para testar o conteúdo do meio em antagonistas do Trimetoprim-Sulfametoxazol
<i>P. aeruginosa</i> (sensível aos AM habitualmente testados)	ATCC 27853	ATCC 27853 NCTC 12934	NCTC 10662	
<i>E. coli</i> (sensível aos AM habitualmente testados)	ATCC 25922	ATCC 25922 NCTC 12241	NCTC 10418	
<i>S. aureus</i> (resistente à Meticilina)	ATCC 43300	NCTC 12493		
<i>E. faecalis</i> (resistente à Vancomicina e Aminoglicosidos alta concentração)	ATCC 51299			
<i>K. pneumoniae</i> (produtora de β lactamases de espectro expandido)	ATCC 700603			
<i>E. coli</i> (produtora de β lactamase)	ATCC 35218	ATCC 35218 NCTC 11954 NCTC 11560		Para testar os inibidores da β lactamase
<i>S.pneumoniae</i> (sensibilidade intermédia à Penicilina)	ATCC 49619	ATCC 49619 NCTC 12977 NCTC 12140		Métodos de difusão em Mueller-Hinton com sangue
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49766	ATCC 49766	NCTC 11913	Para testar Cefalosporinas de 1º e 2º G (orais)
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247	ATCC 49247 NCTC 12699		Para testar antimicrobianos em geral excepto Cefalosporinas de 1ª e 2ª G (orais) no meio HTM.
<i>H. influenzae</i>	ATCC 10211	ATCC 10211		Para testar meio de HTM, especialmente indicado para os fabricantes
<i>N. gonorrhoeae</i>	ATCC 49296	ATCC 49296 NCTC 12700	NCTC 12700	Métodos de difusão em meio de GC

QUADRO n.º 4 - **CONTROLO e MANUTENÇÃO dos EQUIPAMENTOS**

EQUIPAMENTO	FREQUÊNCIA			
	Diária ou em cada utilização ou em cada lote	Semanal	Mensal	Periódica (por pessoal especializado)
Estufas de incubação aerobiose	Registo da temperatura	Verificar humidade (40-50%)	Limpeza	Revisão anual
Estufas de incubação CO₂	Registo da temperatura Verificar pressão de CO ₂ (5-10%) Subcultura de estirpe de <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Limpeza Verificar humidade	Testar com dispositivo de <i>Fyrite</i>	Revisão anual Verificar ventoinha e contaminação com fungos
Jarras de CO₂	Limpeza com água e detergente Subcultura de estirpe de <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Verificar se paredes e tampa estão deterioradas (substituir se necessário)		
Jarras de microaerofilia	Limpeza com água e detergente Subcultura de estirpe de <i>C. jejuni</i> ATCC 33291	Verificar se paredes e tampa estão deterioradas (substituir se necessário)		
Câmara de Anaerobiose	Verificar temperatura e pressão de gás Usar indicador redox: azul de metileno ou resazurina. Reactivar o catalisador (aquecer 2h a 160°C) se aplicável	Cultura controlo de <i>Clostridium novyi A</i> ATCC 19402	Verificar humidade. Limpeza e descontaminação com cloreto de Benzalkonium	Revisão anual
Jarras de anaerobiose	Limpeza com água e detergente. Usar um indicador (azul de metileno /resazurina). Reactivar o catalisador (aquecer 2h a 160°C) se aplicável	Verificar se paredes e tampa estão deterioradas (substituir se necessário)		
Autoclaves	Verificar registos de Temperatura	Testar indicador biológico- <i>Bacillus stearothermophilus</i> Verificar válvulas de segurança.	Limpeza	Revisão anual
Centrífugas	Controlo do equilíbrio Limpeza			Revisão anual Teste com tacómetro
Frigoríficos	Verificar temperatura		Limpeza e descontaminação	Revisão anual Descongelar - bianual
Microscópios	Retirar óleo de imersão. Cobrir para proteger do pó.		Limpeza das lentes e platina	Revisão anual Limpeza, lubrificação e realinhamento
Equip.autom. identificação microbiana e antibioGram	Segundo indicações do fabricante	Segundo indicações do fabricante. Controlo com estirpes de referência	Segundo indicações do fabricante	Revisão anual
Equipamentos automatizados Hemoculturas	Segundo as indicações do fabricante	Segundo as indicações do fabricante	Segundo as indicações do fabricante	Revisão anual
Câmaras de segurança	Verificação do fluxo de ar.Limpeza com álcool 70º			Verificar integridade dos filtros HEPA e o fluxo do ar bianual
Colorador de laminas	Limpeza das superfícies. Filtragem e reposição dos corantes	Limpeza das <i>cuvettes</i> . Renovação dos corantes		Revisão anual

(Alguns dos intervalos entre revisões são da responsabilidade dos autores deste trabalho)

QUADRO n.º 5 - CONTROLO do COMPORTAMENTO dos MEIOS de CULTURA

Meio de cultura	Estirpes de controlo	Incubação	Resultados esperados	
Gelose-sangue (24h aerobiose)	<i>S. pyogenes</i>	24h aerobiose	Desenvolvimento: colónias com β-hemólise	
Gelose-chocolate	<i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	24h aerobiose 24h CO ₂	Desenvolvimento Desenvolvimento	
MacConkey	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	24h aerobiose	Desenvolvimento: colónias rosadas Desenvolvimento: colónias incolores	Colónias rosadas -FL Colónias incolores - NLF
Thayer-Martin (selectivo para <i>N. Gonorrhoeae</i>)	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Candida</i> spp	24h CO ₂	Desenvolvimento Sem desenvolvimento Sem desenvolvimento Sem desenvolvimento	
Gelose selectiva para Campylobacter	<i>C. jejuni</i> <i>E. coli</i>	48h microaerofilia	Desenvolvimento Sem desenvolvimento	
Gelose SS	<i>E. aerogenes</i> <i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i>	24h aerobiose	Desenvolvimento: colónias rosadas Sem ou escasso desenvolvimento Desenvolvimento: colónias incolores com centro negro	
Kligler ou TSI	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i>	24h aerobiose	Rampa pH ácido e base pH ácido, com gás, sem SH ₂ Rampa pH alcalino e base pH ácido, com gás, com SH ₂ Rampa pH alcalino e base pH alcalino, sem gás, sem SH ₂	pH ácido: cor amarela pH alcalino: cor rosa-vermelho SH ₂ : cor negra Gás: bolhas de ar ou meio fracturado
Gelose-sangue para anaeróbios	<i>F. necrophorum</i> <i>C. perfringens</i>	Até às 48 h anaerobiose	Desenvolvimento Desenvolvimento: colónias com dupla zona de hemólise	
Caldo de hemocultura para Aeróbios	<i>S. pneumoniae</i>	24h aerobiose	Desenvolvimento	
Caldo de hemocultura para Anaeróbios	<i>B. fragilis</i>	24h anaerobiose	Desenvolvimento	
Thioglicolato, BHI ou outros	<i>B. fragilis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>	24h anaerobiose 24h aerobiose	Desenvolvimento Desenvolvimento Desenvolvimento	
Caldo de Selenito, Tetrionato ou GN	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	12h aerobiose	Desenvolvimento na subcultura Sem ou com escasso desenvolvimento na subcultura	A subcultura deve fazer-se 12h após a inoculação.
Caldo de ureia (produção de urease)	<i>P. vulgaris</i> <i>E. coli</i>	4-6h aerobiose	Positivo: mudança para cor rosa forte Negativo: sem mudança de cor ou cor amarela	

QUADRO n.º 6 - CONTROLO de REAGENTES

Reagente	Microrganismo	Reacção esperada	Comentário
Catalase (H ₂ O ₂)	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus</i> spp	Positiva : borbulha Negativa : não borbulha	Usar H ₂ O ₂ a 3% O teste também pode fazer-se com uma gota de sangue
Coagulase (plasma)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Positiva : formação de coágulo em 4h Negativa : ausência de coágulo	
Indol	<i>E. coli</i> <i>E. aerogenes</i>	Positiva : formação de anel vermelho à superfície em 24h. Negativa : formação de anel amarelo à superfície	O teste em <i>spot</i> pode ser controlado da mesma forma
Oxidase	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Positiva : cor púrpura em 10-30 segundos. Negativa : sem cor em 10-30 segundos	
Factores de crescimento: Discos de X, V, XV	<i>H. influenzae</i>	Crescimento à volta do disco XV, em 24 h	
Optoquina (disco)	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. viridans</i>	Sensível em 24h = halo de inibição de 19 mm Resistente = sem zona de inibição.	
Discos impregnados de antibiótico (para TSA difusão)	Estirpes ATCC indicadas no capítulo TSA	Halo de inibição com diâmetro dentro dos limites esperados (tabela NCCLS)	As tabelas são actualizadas periodicamente
Coloração de Gram	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Gram positivo : cor azul escuro (cocos em cacho) Gram negativo : cor vermelho-rosado (bastonetes)	
Coloração de Kinyoun e Ziehl-Neelsen (ácido-alcool-resistente)	<i>M. gordonae</i>	Bacilos vermelho-rosados sobre um fundo azul	Os laboratórios de nível de segurança 2 podem usar <i>M. tuberculosis</i> .
Coloração de fluorescência (ácido-alcool-resistente)	<i>M. gordonae</i> <i>Streptomyces</i> spp	Positiva : bacilos com fluorescência amarela Negativa : bacilos azuis não fluorescentes	
Kits de identificação de origem comercial	Estirpes de controlo indicadas pelo fabricante	De acordo com indicações do fabricante	As estirpes de controlo são quase sempre estirpes de colecção conhecidas

QUADRO n.º 7 - FREQUÊNCIA do CONTROLO de REAGENTES

Reagente	Frequência do controlo
Reagentes químicos: catalase, coagulase, indol, oxidase, etc	Cada vez que se abre novo frasco e depois em cada dia de utilização
Discos de optoquina, discos de factores de crescimento	Cada vez que se abre novo frasco e depois semanalmente
Discos impregnados de antibiótico (para TSA – difusão)	Cada vez que se inicia novo lote e depois semanalmente
Soros para detecção de antígenos (antiseros de identificação)	Cada vez que abre um frasco novo e depois mensalmente
Coloração de Gram, Kinyoun, Ziehl-Neelsen	Cada vez que se utiliza novo lote ou frasco e depois semanalmente
Coloração de fluorescência	Cada vez que se utiliza novo lote ou frasco e depois em cada utilização
Kits de identificação de origem comercial	Cada novo lote

QUADRO n.º 8 - INDICADORES ou SONDAS de QUALIDADE

Procedimento/ Amostra	Objectivo	Indicador	Análise
Hemoculturas	Utilização adequada	Hemoculturas isoladas ou > 3 hemoculturas/ 24h	Determinar a prevalência e as razões de hemoculturas isoladas ou em n.º excessivo
Hemoculturas	Colheita correcta	Hemoculturas contaminadas	Determinar a % de contaminantes, taxa por serviços, etc. Rever os procedimentos quando verificada uma taxa muito alta
Expectoração	Colheita apropriada	Esfregaço corado pelo Gram: > 25 células epiteliais por campo 10	Determinar a % global e por serviços, de amostras de má Qualidade. Intervenção educativa quando detectada uma % muito elevada
Expectoração	Utilização adequada	Uma única colheita para pesquisa de BAAR	Determinar a % global e por serviços. Determinar as razões de uma única colheita
Expectoração	Interpretação correcta do Gram	Correlação entre a observação do Gram e os resultados da cultura	Rever as discrepâncias e as razões da incorrecta interpretação Do Gram.
Liquor (LCR)	Colheita apropriada	Volume suficiente para os exames requisitados	Determinar o n.º de amostras com volume insuficiente. Calcular a sua % global e por serviços. Rever os procedimentos quando verificada uma taxa muito alta
Liquor (LCR)	Colheita apropriada	Culturas contaminadas	Determinar o n.º de contaminantes e a % global e por serviços. Verificar se a deficiência é do laboratório ou da colheita.
Liquor (LCR)	Utilização adequada	Requisição para serologia da sífilis, pesquisa de antígeno criptocócico ou culturas para micobactérias quando o exame citoquímico é normal	Determinar a % de resultados positivos e a razão dos pedidos. Desenvolver um algoritmo para a requisição dos exames.
Liquor (LCR)	Utilização dos resultados	Instituição de terapêutica face ao resultado preliminar do Gram	Determinar a % de doentes tratados com antibiótico em função do resultado positivo do Gram (deverá ser 100% nos casos inequívocos)
Urina	Colheita apropriada	Culturas com ≥ 2 agentes	Determinar a % global e por serviços (não deverá ser > 5%) Determinar a razão do problema: colheita incorrecta?, atraso no transporte?, etc.
Urina	Utilização adequada	Repetição de colheitas no mesmo doente	Determinar a razão de > 2 colheitas/semana. Infecção suspeita ou confirmada?.
AntibioGram (TSA)	Utilização dos resultados	Correlação da terapêutica antimicrobiana com o TSA	Determinar a % de tratamentos adequados e tratamentos discrepantes. Notificar imediatamente o médico assistente.
AntibioGram (TSA)	Utilização dos antimicrobianos	Taxa cumulativa dos perfis de susceptibilidade aos AM	Publicitação dos dados para as decisões de terapêutica empírica. Revisão dos dados com fins epidemiológicos, ex. : tendências de resistência.

Bibliografia principal (QUADRO N.º 8):

Raymond C. Bartlett. MEDICAL MICROBIOLOGY – quality cost and clinical relevance: John Wiley & sons, 1974.

JJS Snell, ID Farrel, C Roberts. QUALITY CONTROL – principals and practice in microbiology laboratory: PHLS, 1992.

Henry D. Isenberg . Clinical Microbiology procedures Handbook: ASM, 1992.

RC Bartlett, MMSullivan, JZ Tetreault, S Lobel, J Nivard. Evolving approaches to management of Quality in Clinical Microbiology. 1994. Clin Microbiol. Rev. 7: 55-88.

JJS Snell, DFJ Brown, C Roberts. QUALITY CONTROL - principals and practice in microbiology laboratory: PHLS, 1999.

NCCLS. Performance and standards for antimicrobial susceptibility testing, 2002.

EPIDEMIOLÓGICA DAS INFECÇÕES

Os dados de rotina do laboratório constituem o ponto de partida da maioria dos métodos de **vigilância epidemiológica das infecções nosocomiais**. Por outro lado, o laboratório é solicitado, com alguma frequência, a realizar estudos microbiológicos para outros fins que não o de diagnóstico de infecção. O contributo da Microbiologia no Controlo de Infecção abrange as seguintes áreas:

1. **Identificação correcta e atempada dos agentes de infecção**
2. **Vigilância das resistências aos antimicrobianos**
3. **Procedimentos específicos para caracterização de estirpes**
4. **Investigação de surtos**
5. **Culturas para vigilância de doentes e de pessoal**
6. **Culturas para vigilância do ambiente**

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A. Um aspecto fundamental que deve ser tido em consideração quando o laboratório fornece informação para fins epidemiológicos é **a distinção entre nº de agentes isolados e nº de doentes/infecções**. A análise de resultados globais ou de isolamentos leva a distorções significativas pelo que, para além da exclusão de isolamentos repetidos no mesmo doente, deve haver uma política clara sobre a inclusão de estirpes isoladas em infecções da comunidade *versus* infecções nosocomiais por um lado e, por outro, a exclusão de duplicados (quando se considera um isolamento uma mesma infecção).
- B. Do ponto de vista do estudo de resistências e dadas as limitações dos métodos automatizados, o laboratório deve ter a possibilidade de executar métodos manuais para confirmação epidemiológica de resistências.
- C. Finalmente, considerando a necessidade de estudos suplementares ou tipagem de estirpes deve ser definida uma política para conservação de culturas iniciais em casos de microrganismos resistentes ou outros microrganismos “alerta” e a conservação de estirpes multirresistentes específicas consideradas endémicas ou nosocomiais dando origem a surtos.

Não estando no âmbito deste capítulo abordar os aspectos relacionados com a actividade de rotina do laboratório iremos considerar apenas os aspectos da colaboração do laboratório na investigação de surtos, culturas de vigilância de doentes e profissionais, esclarecimento das contaminações ambientais nomeadamente de superfícies, do ar e dispositivos médicos.

INVESTIGAÇÃO de SURTOS

Um surto é definido como o **aparecimento de um número de casos de uma infecção superior ao habitual**. A nível hospitalar e quando se refere, por exemplo, a microrganismos

multirresistentes, um surto é o isolamento, em dois ou mais doentes, da mesma estirpe multirresistente.

A investigação de surtos é necessária para os controlar e evitar novos surtos, para melhorar os conhecimentos no que se refere ao hospedeiro, ao agente e suas inter-relações no ambiente, para avaliar ou iniciar um sistema de vigilância e ainda para desenvolver acções educativas no terreno.

São as seguintes as **etapas de uma investigação de surto**:

1. Identificação do problema

- Comprovar a existência de surto excluindo os “falsos” surtos devidos à mudança de técnicas laboratoriais ou de rotinas de requisição de exames devido a novos profissionais ou novos serviços.
- Confirmar o diagnóstico recorrendo aos isolamentos microbianos, serologia, etc. (é suficiente a confirmação de mais ou menos 20% dos casos)

2. Caracterização do surto

- Definir e contar os casos: recorrer a critérios simples tendo em conta a definição habitual de infecção – trata-se de uma definição epidemiológica e não clínica. No caso de microrganismos multiresistentes deve-se distinguir infecção da colonização.
- Calcular a taxa de ataque.
- Organizar os dados em função de tempo (curva epidemiológica) local e pessoas

3. Identificação das causas e resolução da situação

- Determinar a população de risco
- Formular/testar uma hipótese: veículo comum ou transmissão directa ou indirecta? pessoa a pessoa ou por vector?
- Comparar a hipótese com os factos. Deve haver concordância entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos.
- Aprofundar o estudo para precisar melhor os pormenores da via de transmissão, veículos e dose infectante e para definir melhor os grupos de risco e outros factores pertinentes.
- Redigir o relatório
- Recomendar e implementar as medidas de controlo e prevenção

Em diversas destas etapas é necessária a intervenção do laboratório nomeadamente através de **Tipagem de estirpes**, estudos em doentes, no pessoal ou no ambiente.

TIPAGEM DE ESTIRPES

- A investigação de surtos muitas vezes requer o reconhecimento e diferenciação da estirpe causal. Se se trata da mesma estirpe (clone) pode-se inferir tratar-se de uma fonte ou reservatório comum ou de transmissão de pessoa a pessoa. Tradicionalmente as estirpes epidémicas têm sido caracterizadas, recorrendo a **métodos fenotípicos**, por género, espécie, biotipo, fagotipo, produção de bacteriocina e susceptibilidade aos antimicrobianos. Os métodos fenotípicos reflectem características genéticas e são geralmente bastante específicas. Contudo, são influenciados pela pressão selectiva ambiental, instabilidade de algumas das características, e pelo facto de os padrões de resistências aos antimicrobianos serem fortemente influenciados pelas práticas na utilização de antibióticos.
- Por isso, torna-se por vezes necessário recorrer aos **métodos genotípicos** com análise de DNA cromossómico ou plasmídico que pode dar informação mais rigorosa. Os diversos métodos disponíveis devem ser seleccionados de acordo com o microrganismo implicado e torna-se quase sempre necessário recorrer ao exterior para este tipo de estudos.

Métodos para a vigilância microbiológica de pessoal e doentes

A vigilância microbiológica de profissionais e/ou doentes apenas deve ser iniciada em situações bem definidas de surto. Em casos muito específicos e previamente definidos pode ser necessário fazer culturas de vigilância em doentes imunodeprimidos. É importante salientar que estes estudos devem ter uma abordagem diferente das culturas para fins diagnósticos. É necessário identificar todos os microrganismos presentes e a quantificação é desejável. Por isso, a maioria dos autores não recomenda a vigilância de doentes a não ser em situações de surto, em que se procura um agente específico.

1. Os **locais a cultivar** dependerão do **microrganismo suspeito**:

- ***Staphylococcus aureus*** : colheitas no nariz, axilas, mãos e períneo. Ter presente que 30% de adultos podem ser portadores de *S. aureus*. É essencial confirmar que se trata da mesma estirpe. Um aspecto importante a ter em conta é a presença de situações que podem favorecer a disseminação (dermatite, lesões nasais e paroníquia).
- ***Streptococcus beta hemolítico do grupo A*** : colheita da orofaringe e em situações especiais do anus ou vagina.
- ***Enterobacteriaceae e Enterococcus***: colheita por zaragatoa rectal

2. **Métodos para colheitas das mãos dos profissionais**: são geralmente efectuadas para estudar a contaminação/colonização com microrganismos implicados em surtos a fim de identificar possíveis vias de transmissão cruzada.

- Humedecer zaragatoas estéreis com soro fisiológico ou BHI e friccionar na superfície palmar de ambas as mãos. Semear em meio apropriado de acordo com o microrganismo a pesquisar e incubar 24 horas a 37°C.

- **Alternativa 1:** colocar 50ml de BHI num saco estéril. Friccionar as mãos dentro do líquido durante 1 minuto. Semear e incubar conforme indicado.
- **Alternativa 2:** Pressionar a face palmar da mão sobre a superfície da placa. Incubar as placas conforme indicado.

Interpretação dos resultados: como o objectivo é encontrar um microrganismo específico a interpretação é fácil devendo ser seleccionados os meios de cultura selectivos que facilitem o isolamento do agente pretendido.

- Para fins educativos podem-se fazer colheitas por impressão das polpas dos dedos, incluindo o polegar, numa placa de gelose. É um método quantitativo e não há indicação para identificação dos microrganismos encontrados. O limite aceitável para mãos limpas é de menos de 5 ufc/dedo.

VIGILÂNCIA MICROBIOLÓGICA DO AMBIENTE

- **Inclui o estudo de superfícies (clínicas e domésticas), ar e água. A monitorização ambiental deve ser planeada cuidadosamente porque constitui um acréscimo de custos, não existem padrões validados para comparação podendo-se gerar dados inconclusivos levando à implementação de procedimentos desnecessários.**
- Actualmente recomenda-se a monitorização sistemática de processos de esterilização, água e líquidos utilizados em hemodiálise, bancos de leite materno, órgãos de transplante e câmaras de fluxos laminares. Estes estudos têm sistemas próprios ou são efectuados em laboratórios especializados não sendo função dos laboratórios de microbiologia hospitalares.
- As situações especiais onde pode ser solicitada a colaboração do laboratório são a investigação epidemiológica para identificar reservatórios ou fontes ou, por vezes, quando se pretende provar a eficácia de um método de limpeza ou desinfeção. Poderá envolver dispositivos médicos, ar, água e outros fluidos, alimentos e superfícies.

Considerações gerais

- Nunca se deve iniciar estudos do ambiente antes de se decidir de forma clara o objectivo pretendido, os critérios para avaliação dos resultados e as acções a tomar face aos resultados obtidos.
- Deve-se iniciar por uma revisão dos resultados dos últimos meses a fim de identificar padrões ou situações de aparecimento do agente em estudo. Dada a especificidade dos locais e métodos de colheita em função do agente suspeito, recomenda-se uma revisão bibliográfica prévia para orientação.
- Os estudos epidemiológicos devem ser feitos por solicitação e com a colaboração da CCIH. Antes de iniciar o estudo, deve-se elaborar conjuntamente um plano escrito com descrição clara dos locais, número, métodos e frequência de colheitas, definir se se trata de um estudo qualitativo e/ou quantitativo, os métodos de processamento, tempo e condições de incubação e critérios de leitura dos resultados e intervenções possíveis em função dos resultados esperados/encontrados.

Métodos de estudo do ambiente

- Podem ser estudos qualitativos e/ou quantitativos. Deve-se ter em conta a possibilidade de falsos negativos devido à presença de resíduos de desinfetantes, inóculos muito pequenos e microrganismos com exigências específicas. As colheitas devem ser efectuadas em condições rigorosas de assépsia.
- Nos métodos quantitativos faz-se uma contagem de colónias. Nos métodos qualitativos devem ser seleccionadas para identificação pelo menos duas colónias representativas de cada tipo morfológico presente nas culturas.
- Os meios de cultura utilizados para análise quantitativa devem ser nutritivos, não selectivos (como o BHI ou tripticase soja) com ou sem sangue. Para o estudo qualitativo são utilizados meios selectivos. Quando indicado, deve-se utilizar um meio para neutralizar detergentes ou desinfetantes presentes. A selecção do neutralizador depende do desinfetante residual presente.

Quadro 1: Neutralizadores de desinfetantes químicos

Glutaraldeído; Formaldeído	Glicina
Fenólicos	Tween 80
Amónios quaternários	Lecitina + Tween 80
Cloro; Iodo	Tiosulfato de sódio
Peróxido de hidrogénio	Catalase

Nota: o Tween 80 é muitas vezes recomendado como um suplemento para os líquidos usados para colheitas por lavagem

Os tempos e temperaturas recomendadas para incubação são os seguintes:

Bactérias	Tripticase soja	30°C +/- 1°C	3 dias
Fungos		25°C +/- 1°C	5 dias

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DE SUPERFÍCIES E DISPOSITIVOS

1. Estudo microbiológico de superfícies: placas de contacto

Não é um método para estudo da carga biológica porque apenas recolhe uma pequena proporção de microrganismos presentes. Avalia a qualidade de higiene de superfícies planas como chão, mesas, alguns equipamentos e roupas.

- Pressionar a superfície de placas (tipo RODAC) contra a área a estudar e incubar. São necessários um mínimo de 15 placas para uma sala média. A incubação deve ser de 48 horas. Não deve ser utilizado em superfícies sujas ou húmidas porque o elevado nº de ufc previsto não permitirá uma leitura adequada das placas.
- Roupa: embora não existam padrões para a roupa limpa considera-se que a presença de menos de 5 ufc por placa constitui um resultado aceitável.

2. Método de “lavagem”

- Se o artigo o permitir, imergir totalmente a peça em BHI contido num recipiente estéril
- Retirar e estudar o líquido
- Para artigos como nebulizadores ou tubagens de equipamento respiratório introduzir o líquido nos canais, agitar e recolher o líquido para estudo

3. Colheita com zaragatoa

- Para superfícies grandes, planas e não absorventes, criar um molde (“template”) para delimitar a área (p.ex. 5cm x 5cm) e friccionar a área com zaragatoa humedecida em soro fisiológico ou BHI. Os moldes são geralmente feitos em cartolina e esterilizados.
- Para superfícies irregulares ou com reentrâncias: friccionar a zaragatoa de forma repetida (10 vezes) e consistente de modo a cobrir todas as áreas.
- A interpretação dos resultados depende dos objectivos do estudo. No caso de dispositivos médicos o resultado deve ser analisado em função de se tratar de material crítico (ausência total de microrganismos), semi-crítico ou não crítico (ausência de agentes patogénicos). Embora não existam padrões estabelecidos, têm sido recomendados os seguintes critérios:
 - 0 a 25 colónias – BOM
 - 26 - 50 colónias – ACEITÁVEL
 - > 50 colónias – MAU

Quadro 2: Principais agentes nosocomiais e suas fontes

Agente	Fonte ambiental	fonte humana
<i>Klebsiella</i>	Equipamento de suporte respiratório	faringe, fezes, urina
<i>Enterobacter</i>	Fluidos IV; água	mãos, fezes, urina
<i>Serratia</i>	Equipamento de suporte respiratório	mãos, urina
<i>P.aeruginosa</i>	Água, desinfetantes, Equipamento de suporte respiratório	mãos, faringe, fezes urina
<i>B. cepacia</i>	Reservatórios de água, equipamento contaminado	mãos
<i>S. maltophilia</i>	Água	mãos
<i>Proteus/Morganella</i>	Água	mãos, urina
<i>Providencia</i>	Água	
<i>Flavobacterium</i>	Água, fluidos IV	mãos
<i>Citrobacter</i>	Água	mãos
<i>Acinetobacter</i>	Equipamento de suporte respiratório	mãos, secreções respiratórias
<i>Staphylococcus</i>	-	mãos, nariz
<i>C. difficile</i>	Superfícies em redor de doentes e zonas sujas	mãos, fezes
<i>Legionella</i>	Água, torres de arrefecimento	secreções respiratórias
Micobacterias atípicas	Água da torneira, equipamento respiratório contaminado	secreções respiratórias

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO AR

- O número de partículas no ar varia em função das condições atmosféricas, movimentação de pessoas, operação de equipamento e materiais em uso. A avaliação microbiológica do ar não deve ser iniciada de ânimo leve porque a execução das colheitas e a interpretação das placas é relativamente complexa dada a inexistência de padrões uniformes e o facto de que as partículas no ar podem estar livres ou aglomeradas (com vários microrganismos) e a probabilidade de as mesmas serem desfeitas ser maior ou menor conforme os métodos de colheita.
- É importante salientar que os dados obtidos são apenas valores indicativos e não valores absolutos reais. Para se ter uma apreciação global é necessário analisar as partículas com 0,5 μ ou maiores.
- Os métodos disponíveis para o estudo do ar podem ser activos ou passivos. Nos métodos activos existem equipamentos que recolhem, por técnicas diversas, um volume estabelecido de ar que contacta com placas contendo os meios de cultura apropriados. Os resultados não estão padronizados e dependem do volume de ar, a velocidade do fluxo e o tempo da sua recolha (que são variáveis para cada tipo de aparelho) e ainda do número de microrganismos presentes. As exigências para este tipo de aparelhos são as seguintes: capacidade de detecção de níveis baixos de contaminação, possibilidade de controlar o volume do ar, facilidade de manuseamento, de limpeza, desinfeção e esterilização e ainda a validação do método.
- Os locais de colheita devem ser seleccionados em função do risco: mesa operatória, mesa de instrumentação, locais onde há menor circulação do ar. Deve-se fazer duas colheitas de cada local.
- No método passivo mede-se a sedimentação de partículas através da exposição de placas contendo meios de cultura apropriados. Não há correlação com os métodos activos já que a sedimentação é afectada pelo tamanho, forma e velocidade de deposição das partículas e não é possível controlar o volume de ar estudado. No entanto, constitui um método simples e barato de avaliação quantitativa, podendo ter indicação nas situações menos complexas. A fim de permitir uma padronização deve-se utilizar placas de 9 cm de diâmetro colocadas a um nível de 1 metro do chão e afastadas um metro das paredes e expostas durante 1 hora. A incubação deve ser feita a 37°C durante 24 horas.
- **Fungos** - O ar transporta fungos oriundos do solo, ambientes hospitalares húmidos e locais em obras. Dado a sua ubiquidade, a sua avaliação só interessa em meios controlados (ambientes com ventilação com filtros HEPA, fluxos laminares, etc.). Nestas situações o que interessa é a avaliação quantitativa em comparação com ambientes contíguos não controlados. Os resultados permitirão determinar a eficácia do sistema de ventilação e o seu eventual papel nas infecções em doentes imunodeprimidos.

Apenas se recomenda o estudo de fungos no ar nas seguintes situações:

1. **Infecções nosocomiais atribuídas a fungos aerotransportados**
2. No decurso de **obras na proximidade de serviços com neutropénicos**
3. **Após a instalação de sistemas de ventilação** especiais e antes de ocupação das respectivas instalações.

Nos equipamentos de fluxo laminar, blocos operatórios, farmácia etc. deve ser feita por outros métodos nomeadamente contagem de partículas e anemómetro.

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DE LÍQUIDOS

- Existem vários métodos para o estudo microbiológico de líquidos e a selecção de um deles depende da natureza do líquido (*pour plates*, *spread plates*, filtros de membrana).
- O estudo microbiológico da água requer métodos especiais pelo que deve ser efectuado em laboratórios especializados. As amostras devem ter um mínimo de 100 ml e a colheita deve ser feita com equipamento estéril, recomendando-se a adição de um agente redutor (tiosulfato de sódio) para neutralizar o cloro residual. Antes de efectuar colheitas em torneiras deve-se deixar correr bastante água e no caso de torneiras misturadoras, estas devem ser desmontadas. As amostras devem ser transportadas frias e trabalhadas dentro de 24 horas.

Bibliografia

1. Checko PJ. Cap 15: APIC Text of Infection Control and Epidemiology – 2000 Ed. Association of Professionals in Infection Control and Epidemiology Inc.
2. Pfaller MA e Herwaldt LA. The Clinical Microbiology Laboratory and Infection Control: Emerging Pathogens, Antimicrobial Resistance and New Technology. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 25:858-870
3. Goldmann DA in *Manual of Clinical Microbiology* 1980, 3ª Ed. American Society for Microbiology
4. Gilchrist MJR in Section II Epidemiology and Infection Control *Microbiology: Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 1992. Ed. Henry Eisenberg, American Society for Microbiology
5. McGowan JE e Weinstein RA The Role of the Laboratory in Control of Nosocomial Infection. Cap 9 in *Hospital Infections* 3ª Ed. Editores: J V Bennett e P S Brachman. Little, Brown and Company, 1992
6. Favero MS e Bond WW. In *Disinfection, Sterilization and Preservation* 4th Edition. Ed. Seymour Block, Lea & Febiger, 1991
7. Rosen-Kotilainen. Cap 67-1: APIC Text of Infection Control and Epidemiology – 2000 Ed. Association of Professionals in Infection Control and Epidemiology Inc.
8. Simmons BP *Guidelines for Hospital Environmental Control*. Centers for Disease Control, 1981
9. Barrie D. How hospital linen and laundry services are provided. *JHI* (1994) 27; 219-235
10. Schaffer JG. Cap 22: *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* 15ª Ed. Editores Israel Davidsohn e John Bernard Henry. W.B Saunders Company, 1974
11. Ristuccia MS e Cunha BA Cap 14. *Microbiologic Aspects of Infection Control: Prevention and Control of nosocomial Infections*. Ed Richard P. Wenzel Williams & Wilkins, 1987
12. Dharan S. e Pittet D. Environmental controls in Operating Theatres *Journal of Hospital Infection* 2002 51:79-84
13. Ljunqvist B e Reinmüller. *Journal of Physical Science and Technology* 2000.Vol 54 :112-116
14. ISO/DIS 14698 *Cleanrooms and associated controlled environments – Biocontamination control*, 1999
15. Pasquarella : et al The index of microbial air contamination *JHI* (2000) 46; 241-256
16. Greene JN, Charles W e Stratton IV. Role of the Microbiology Laboratory in Hospital Epidemiology and Infection Control Cap. 86 pg 1138-1146 in *Hospital Epidemiology and Infection Control* Editor GlenMayhall C, 1996

