

MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame
à Análise Microbiológica e Laudo Final



MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais:
da Requisição do Exame à Análise
Microbiológica e Laudo Final

Copyright © 2013 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

A Anvisa, igualmente, não se responsabiliza pelas idéias contidas nessa publicação.

1ª edição – 2010

Elaboração, distribuição e informações:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: www.anvisa.gov.br

Diretoria

Dirceu Brás Aparecido Barbano – Diretor-Presidente

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Adjuntos de Diretor

Luiz Roberto Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araujo de Oliveira

Doriane Patrícia Ferraz de Souza

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde –

GGTES

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de

Saúde – GVIMS

Magda Machado de Miranda Costa

Coordenação Técnica:

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos – Anvisa

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas – SP

Redação:

Ângela Von Nowakowsky – Universidade de Campinas(UNICAMP) – SP

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas(UNICAMP) – SP

Cássia Maria Zoccoli – Laboratório Médico Santa Luzia – SC

Elsa Masae Mamizuka – Universidade de São Paulo-USP – SP

Emerson Danguí Cavassin – Universidade Estadual de Londrina – PR e

Laboratório Fleury – SP

Maria Rita Elmor de Araujo – Hospital Beneficência Portuguesa – SP e

Hospital do Coração – SP

Revisão técnica – Anvisa:

André Anderson Carvalho

Fabiana Cristina de Sousa

Heiko Thereza Santana

Magda Machado de Miranda

Suzie Marie Gomes

Cooperação técnica:

Termo de Cooperação nº 64

Organização Pan-Americana da Saúde

Organização Mundial da Saúde

Representação Brasil

Joaquin Molina – Representante

Enrique Vazquez – Coordenador da Unidade Técnica de Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Rogério da Silva Lima – Consultor Nacional da Unidade Técnica de Doenças

Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Projeto Gráfico e Diagramação:

All Type Assessoria Editorial Ltda

Capa:

Camila Contarato Burns – Anvisa

Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4 : Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

95p.: il.9 volumes

ISBN

1. Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Título.

SUMÁRIO

Apresentação	7
Capítulo 1: Requisição de Exames Microbiológicos.....	9
1.1 Modelos para requisição de exames microbiológicos.....	10
1.1.1 Identificação clara do paciente (Modelo 1).....	10
1.1.2 Informações sobre o paciente que são relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso (Modelo 2).....	11
1.1.3 Descrição da amostra (Modelo 3).....	12
1.1.4 Natureza do Teste Solicitado (Modelo 4).....	13
1.1.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Modelo 5).....	13
1.1.6 Solicitação de testes especiais (Modelo 6).....	13
1.1.7 Exames especiais de interesse da CCIH.....	14
Capítulo 2: Coleta, Transporte e Conservação de Amostra.....	15
2.1 Introdução.....	15
2.2 Aspectos básicos da coleta e do transporte de amostra.....	16
2.2.1 Coleta.....	16
2.2.2 Transporte das amostras.....	17
2.2.3 Critérios de rejeição para amostras clínicas.....	18
2.3 Instruções para hemoculturas.....	19
2.3.1 Material para realizar a coleta.....	22
2.3.2 Técnica para coleta.....	22
2.3.3 Transporte.....	24
2.4 Instruções para ponta de cateter intravascular.....	24
2.4.1 Indicação.....	24
2.4.2 Técnica de retirada da ponta ou segmento de cateter.....	24
2.5 Instruções para secreção traqueal.....	25
2.6 Instruções para lavado bronco-alveolar (BAL).....	25
2.7 Instruções para coleta de secreção de orofaringe.....	26
2.8 Instruções para fluidos orgânicos estéreis.....	27
2.8.1 Líquor.....	27
2.8.2 Instruções para feridas, abscessos e exsudatos.....	28
2.8.3 Cultura para anaeróbios de secreções de feridas e abscessos.....	28
2.9 Instruções para amostras de pele e tecido subcutâneo em queimadura.....	29
2.10 Instruções para biópsia da pele.....	29
2.11 Instruções para biópsias de gânglios e amostras cirúrgicas.....	29
2.12 Instruções para tecido ósseo.....	30
2.13 Instruções para lesões superficiais – coleta para fungos – micológico direto.....	30
2.14 Instruções para secreção de ouvido.....	30

2.15	Instruções para secreção ocular.....	31
2.16	Coleta de material urogenital.....	31
2.16.1	Instruções para material genital.....	31
2.16.2	Secreção cervical e vaginal.....	33
2.16.3	Secreção uretral.....	34
2.17	Instruções para secreção anal.....	35
2.18	Instruções para coleta de fezes.....	35
2.18.4	Swab retal.....	36
2.19	Instruções para coleta de urina.....	36
2.19.1	Coleta de urina de mulheres.....	36
2.19.2	Coleta de urina para crianças que não têm controle da micção.....	37
2.19.3	Coleta de urina para homens.....	37
2.19.4	Pacientes cateterizados com sistema de drenagem fechada.....	37
2.19.5	Amostras de urina colhidas da extremidade do cateter de Foley.....	38
2.19.6	Coleta de urina para cultura de micobactérias.....	38
2.19.7	Transporte de urina.....	38
2.20	Instruções para cultura de anaeróbios em materiais diversos.....	38
2.20.1	Avaliação das amostras para cultura de anaeróbios.....	39
2.20.2	Tempo de transporte x volume de amostra e/ou método coletado.....	40

Capítulo 3: Microscopia e Coloração 41

3.1	Direto sem coloração.....	41
3.1.1	Salina.....	41
3.1.2	Hidróxido de potássio.....	41
3.1.3	Exame em campo escuro.....	42
3.1.4	Tinta da China.....	42
3.2	Coloração de Gram.....	43
3.2.1	Equipamentos e materiais necessários.....	43
3.2.2	Esfregaços.....	44
3.2.3	Material Clínico.....	44
3.2.4	Preparo do reagente para a coloração de Gram (modificado por Hucker).....	46
3.2.5	Coloração.....	47
3.2.6	Como reportar os resultados.....	48
3.2.7	Leitura do Gram.....	48
3.2.8	Causas comuns de erro.....	48
3.2.9	Controle de qualidade.....	49
3.3	Outras colorações.....	50
3.3.1	Albert Laybourn (Corinebactérias).....	50
3.3.2	Coloração de Ziehl-Neelsen.....	50

Capítulo 4: Semeadura em Meios de Cultura 53

4.1	Material clínico e os respectivos meios de cultura.....	54
-----	---	----

4.1.1	Meios de cultura para semeadura dos principais materiais clínicos e indicação de exames microscópicos, que podem ser alterados conforme suspeita clínica	54
4.1.2	Cultura para fungos ou micobactérias	54
4.1.3	Coprocultura	55
4.1.4	Escarro para tuberculose	55
4.1.5	Lavado brônquico	55
4.1.6	Líquido Céfalo Raquidiano (LCR).....	55
4.1.7	Ponta de cateter	55
4.1.8	Hemoculturas positivas	56
4.1.9	Urina	56
4.1.10	Secreção vaginal, endocervical, uretral e urina	56
4.1.11	Para amostras sólidas: biópsias, gânglios, amostras de tecidos, etc.....	57
4.1.12	Líquido de diálise	57
4.1.13	Casos especiais	57
4.1.14	Escolha de meios de cultura seletivos em relação ao agente.....	58
4.2	Procedimentos para semeadura em meios de cultura.....	58
4.2.1	Semeadura qualitativa	58
4.2.2	Técnica de Semeadura Qualitativa	59
4.2.3	Semeadura quantitativa.....	59
4.2.4	Procedimentos gerais	60
4.2.5	Incubação	60
4.2.6	Características macroscópicas das colônias	61
4.2.7	Avaliação do crescimento e contagem.....	63

Capítulo 5: Identificação **65**

5.1	Meios de cultura	65
5.2	Coloração de Gram.....	66
5.2.1	Gram-positivos	66
5.2.2	Gram-negativos.....	66
5.3	Esquema geral de identificação bacteriana.....	66
5.3.1	Crescimento bacteriano.....	66
5.3.2	Coloração de Gram das colônias isoladas	68
5.3.3	Direcionamento da identificação	68

Capítulo 6: Interpretação de Resultados e Laudos..... **69**

6.1	Introdução.....	69
6.1.1	Análise microbiológica.....	70
6.1.2	Algumas sugestões importantes	70
6.2	Laudo para hemocultura	72
6.3	Ponta de cateter	73
6.4	Laudo para o trato respiratório superior – ouvido e ocular.....	73

6.4.1	Orofaringe.....	73
6.5	Nasal	74
6.6	Epiglote/Nasofaringe.....	74
6.7	Seios da face	75
6.8	Ouvido	75
6.8.1	Otite externa:.....	75
6.8.2	Otite média:	76
6.9	Laudo para ocular	76
6.10	Trato respiratório inferior	77
6.10.1	Laudo para escarro.....	77
6.11	Laudo para aspirado de secreção traqueal	78
6.11.1	Relatório	78
6.12	Laudo para lavado brocoalveolar ou escovado brônquico	79
6.12.1	Relatório da bacterioscopia	79
6.12.2	Relatório da cultura	79
6.12.3	<i>Candida</i> em secreções respiratórias.....	79
6.13	Laudo para pleural	80
6.14	Laudo para abscesso pulmonar	80
6.15	Laudo para Líquido Céfalo Raquidiano (LCR)	80
6.16	Laudo para pele, abscessos profundos e feridas	81
6.16.1	Ferida / Lesão cutânea	82
6.16.2	Ferida cirúrgica	83
6.16.3	Dreno / Fístula	83
6.17	Biópsia.....	84
6.17.1	Gânglio.....	84
6.18	Laudo para genital	85
6.18.1	Uretral.....	85
6.18.2	Vaginal	86
6.18.3	Endocervical.....	88
6.18.4	Esperma e/ou fluido prostático.....	88
6.19	Laudo para coprocultura	90
6.20	Laudo para urocultura.....	91
6.20.1	Urinas coletadas por jato médio	91
6.20.2	Urinas coletadas por cateterização	92
6.20.3	Urinas coletadas por punção suprapúbica	93
6.20.4	Observações.....	94
6.21	Referências Bibliográficas.....	95

APRESENTAÇÃO

A resistência microbiana é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência microbiana.

Nesse contexto, insere-se o Laboratório de Microbiologia, que tem como objetivo não apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas também indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos micro-organismos que estão interagindo com o organismo humano, possibilitando a indicação de tratamentos mais adequados. Para o desempenho satisfatório dessa função, é fundamental que os laboratórios de microbiologia possuam estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota e os contaminantes, identificar micro-organismos associados à infecção ou com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, realizar o transporte rápido das amostras e manter uma educação contínua em relação aos aspectos da infecção relacionada à assistência à saúde.

Tendo em vista esses aspectos e considerando que a microbiologia é um campo muito dinâmico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, em cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, propõe a terceira revisão do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, buscando atualizar informações nos temas considerados essenciais e contando com um seleto e conceituado corpo editorial. O manual é composto por nove módulos, a saber: Módulo 1 – Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica; Módulo 2 – Controle externo da qualidade; Módulo 3 – Principais Síndromes Infecciosas; Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final; Módulo 5 – Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos; Módulo 6 – Detecção e identificação de bactérias de importância médica; Módulo 7 – Detecção e identificação de micobactérias de importância médica; Módulo 8 – Detecção e identificação de fungos de importância médica e Módulo 9 – Infecções virais.

A Anvisa e a OPAS esperam com essa publicação contribuir para que os laboratórios de microbiologia possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada unidade hospitalar, – além de subsidiar a adoção de procedimentos básicos padronizados nesses serviços.



Capítulo 1: Requisição de Exames Microbiológicos

*Carlos Emílio Levy
Emerson Dangui Cavassin*

Deve-se ressaltar que o envolvimento do médico com o laboratório de microbiologia é de grande valia para ambos, pois propicia melhor orientação técnica e maior objetividade, facilita a interpretação e aproxima o resultado do exame às necessidades clínicas.

Muitas vezes, o exame microbiológico possui etapas interpretativas:

- como na análise de materiais que envolvem microbiota residente ou transitória;
- no caso da pesquisa de agentes específicos, em que é fundamental a escolha de meios seletivos ou enriquecedores;
- na ampliação do tempo de cultivo ou na variação na temperatura de incubação;
- na realização de novos testes comprobatórios.

O relacionamento entre clínica e laboratório começa com o preenchimento da requisição do exame. O médico muitas vezes considera um desperdício de tempo o preenchimento de mais de uma requisição para o exame microbiológico. Assim, o microbiologista ou responsável pela rotina deverá conferir as requisições ou pedidos de exame de cada material para verificar a existência de pedido com informações necessárias.

É interessante que exista um roteiro de verificação das informações que podem ser úteis e valorizadas em diferentes etapas do processamento do exame. Essas informações estão agrupadas em modelos de requisição de exame, que podem ser adequadas à realidade e necessidades de cada laboratório.

- Identificação clara do paciente (**Modelo 1**).
- Informações sobre o paciente que são relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso (**Modelo 2**).
- Descrição da amostra (**Modelo 3**).

- Natureza do Teste Solicitado (**Modelo 4**).
- Testes de sensibilidade (**Modelo 5**).
- Testes especiais (**Modelo 6**).

Sugere-se que cada laboratório utilize as informações a seguir para elaborar uma requisição de exames clara e objetiva, adaptado a sua realidade; que disponibilize um Manual de orientação para solicitação e coleta de exames e, quando possível, exiba no *site* do laboratório essas informações de forma mais detalhada, além de periodicamente oferecer treinamento aos profissionais e alunos envolvidos no tema.

1.1 Modelos para requisição de exames microbiológicos

1.1.1 Identificação clara do paciente (Modelo 1)

Nome completo:									
Registro nº (do hospital ou serviço):	Data de nascimento: (para evitar confusão com homônimos e com a faixa etária) <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none; width: 20px; height: 20px;"> </td> </tr> </table>								
Sexo: (a interpretação de bacteriúria pode ser diferente para a mulher) <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino	 <input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Leito <input type="checkbox"/> Ambulatório								
Campo para identificação do exame no Laboratório (número da análise microbiológica e seção do laboratório)									

1.1.2 Informações sobre o paciente que são relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso (Modelo 2)

Hipótese diagnóstica	
Dados clínicos (descrever objetivamente os achados clínicos mais significativos, lesões cutâneas ou de mucosas, local e características do sítio de infecção, etc.)	
Dados epidemiológicos relevantes (viagem ou excursão, se vive em área endêmica de alguma doença infecciosa como malária, riquetsioses, cólera; doença ocupacional, por exemplo, contato com animais; acidentes – mordida, trauma, picada de carrapato, enchentes; envolvimento em surto de infecção relacionada à assistência à saúde, etc.)	
Outros dados laboratoriais importantes (que evidenciem o sítio do processo infeccioso: RX, tomografia, urina rotina, hemograma, etc.)	
Provável origem do processo infeccioso: <input type="checkbox"/> Comunitário <input type="checkbox"/> Hospitalar	Relacionado a procedimento invasivo? Qual? (sonda vesical, cateter, traqueostomia, diálise, alimentação parenteral, cirurgia)
Cirurgia? Qual?	Existe infecção em outra topografia? Qual?
Fez uso nos últimos dez dias de antibióticos? Quais? (descrever os motivos do uso)	
Existe comprometimento imunológico? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(prematuridade, transplante de órgãos, uso de imunossupressores, diabetes, câncer, Aids, leucemia, anemia falciforme, talassemia, hemofilia, esplenectomia, cirrose, etc.; doença oportunista?)
É paciente transferido ou de alta de outro hospital nos últimos 30 dias? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	É portador, colonizado ou infectado por bactérias multirresistentes? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Para urocultura informar: <input type="checkbox"/> Sintomático <input type="checkbox"/> Assintomático	Data do pedido ____ ____ ____ ____ ____ ____ ____ ____
Nome legível do médico/CRM, carimbo e/ou telefone de contato (facilita a comunicação para situações emergenciais (isolamento de M. tuberculosis, cepa multirresistente, notificação compulsória, etc).	
Data ____ ____ ____ ____ ____ ____ ____ ____	Hora da coleta ____ ____ ____
Nome e identificação de quem colheu o material (permite reavaliação de procedimentos e reciclagem, por exemplo, quando se detecta excesso de contaminação)	
Observações (comentários, quando necessários, sobre o procedimento de coleta. Por exemplo, acidentes ou dificuldades para obtenção do material, condições do paciente, quantidade, etc)	

1.1.3 Descrição da amostra (Modelo 3)

Hemocultura: <input type="checkbox"/> Sangue periférico <input type="checkbox"/> Sangue colhido de cateter		Urocultura: <input type="checkbox"/> Jato médio <input type="checkbox"/> Sonda de alívio <input type="checkbox"/> Sonda vesical de demora <input type="checkbox"/> Punção suprapúbica <input type="checkbox"/> Saco coletor	
Trato Respiratório: <input type="checkbox"/> Orofaringe <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Aspirado Traqueal <input type="checkbox"/> Lavado bronco-alveolar <input type="checkbox"/> Escovado brônquico <input type="checkbox"/> Outros			
Lesões, secreções, abscessos: <input type="checkbox"/>		Descrever topografia:	
Nível da coleta: <input type="checkbox"/> Superficial <input type="checkbox"/> Profunda		Via de obtenção do material: <input type="checkbox"/> Punção <input type="checkbox"/> Swab <input type="checkbox"/> Raspado <input type="checkbox"/> Fragmento <input type="checkbox"/> Drenagem <input type="checkbox"/> Fístula <input type="checkbox"/> Outros	
Líquidos cavitários: <input type="checkbox"/> Líquor <input type="checkbox"/> Líquido pleural <input type="checkbox"/> Pericárdico <input type="checkbox"/> Sinovial <input type="checkbox"/> Ascítico			
Próteses <input type="checkbox"/>		Local:	
Pontas de cateter vascular <input type="checkbox"/>		Tipo do cateter:	
Cateter de diálise <input type="checkbox"/>		Outros:	
Justificativa do envio para exame microbiológico			

1.1.4 Natureza do Teste Solicitado (Modelo 4)

Exame microscópico: <input type="checkbox"/> A fresco <input type="checkbox"/> Campo escuro	Direto com coloração: <input type="checkbox"/> Gram <input type="checkbox"/> Giemsa <input type="checkbox"/> Ziehl <input type="checkbox"/> Outro	Qual:
Pesquisa de: <input type="checkbox"/> <i>Pneumocystis (carinii) jiroveci</i> - <input type="checkbox"/> <i>Cryptosporidium</i> <input type="checkbox"/> <i>Isospora belli</i>		
Cultura: <input type="checkbox"/> Rotina bacteriológica <input type="checkbox"/> Rotina para fungos <input type="checkbox"/> Rotina para micobactérias <input type="checkbox"/> Rotina para vírus		
Específicos: <input type="checkbox"/> Rotina para anaeróbios <input type="checkbox"/> Micoplasma <input type="checkbox"/> Legionella spp. <input type="checkbox"/> Helicobacter spp.		
Outros testes: (em geral realizados sob consulta)		

1.1.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Modelo 5)

Qualitativo, por disco difusão (Kirby – Bauer) <input type="checkbox"/>	Quantitativo, definição da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através de métodos dilucionais <input type="checkbox"/>
E-test® <input type="checkbox"/>	Antibiograma com drogas adicionais (desde que padronizadas pelo CLSI).
Pesquisa e dosagem de antimicrobianos no sangue, LCR, etc. <input type="checkbox"/>	Determinação do poder bactericida do soro.
Teste de sensibilidade de fungos ou micobactérias. <input type="checkbox"/>	

1.1.6 Solicitação de testes especiais (Modelo 6)

Aglutinação com látex para meningite. <input type="checkbox"/>	Testes imunológicos diretamente no material clínico: Chlamydia trachomatis (genital), Streptococcus pyogenes (orofaringe). <input type="checkbox"/>
Pesquisa de toxinas (S. aureus, Limulus teste para endotoxinas de Gram (-), Clostridium difficile etc.) <input type="checkbox"/>	Tipagem para fins epidemiológicos em investigação de surtos ou fontes de infecção relacionada à assistência à saúde. <input type="checkbox"/>
PCR (polimerase chain reaction) para micobactérias ou outros disponíveis. <input type="checkbox"/>	Exames quantitativos (exceto os de rotina) como hemocultura de sangue periférico ou de cateter, biópsia de tecidos ou líquido de diálise peritoneal. <input type="checkbox"/>

1.1.7 Exames especiais de interesse da CCIH

- () Controle de contaminação de medicamentos, frascos de soros, bolsas de sangue e hemoderivados
- () Portadores de microrganismos multirresistentes VRE, KPC, etc.
- () Contaminação de equipamentos, ambientes, etc.
- () Teste de sensibilidade a antimicrobianos não padronizados no Hospital

Observações:

Além da solicitação de exame incompleta ou mal formulada e falhas técnicas durante a realização do exame, outros fatores muito importantes podem comprometer a qualidade e utilidade do resultado final:

- Hipótese diagnóstica mal elaborada.
- Informações mal colhidas, incompletas, ou não devidamente interpretadas.
- Coleta, conservação e transporte inadequados.
- Coleta de material não representativo do processo infeccioso.
- Demora na liberação de resultado.
- Interpretação errônea pelo médico dos resultados. Na dúvida, ligar para o laboratório!

Capítulo 2:

Coleta, Transporte e Conservação de Amostra

*Cássia Maria Zoccoli
Ângela Von Nowakovsky
Carlos Emílio Levy*

2.1 Introdução

Todo resultado liberado pelo laboratório de microbiologia depende de uma série de etapas, todas fundamentais, iniciando-se pela qualidade da amostra.

O material coletado deve ser representativo do processo infeccioso investigado, elegendo-se o melhor sítio da lesão e evitando-se contaminação com as áreas adjacentes.

A coleta e o transporte inadequados podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o desenvolvimento da microbiota contaminante, induzindo a um tratamento não apropriado. Portanto, procedimentos adequados de coleta devem ser adotados para evitar o isolamento de um “falso” agente etiológico.

O profissional responsável pela coleta será também responsável por identificar de forma correta e legível o material a ser encaminhado ao laboratório de microbiologia.

Sugerimos a leitura do fascículo Principais Síndromes Clínicas que poderá ser útil na orientação da solicitação de exames microbiológicos.

Além do pedido completo, na amostra devem estar presentes as seguintes informações:

- Nome e registro do paciente.
- Leito ou ambulatório e especialidade.
- Material colhido.
- Data, hora e quem realizou a coleta.

Observação: sempre colocar a identificação no corpo do recipiente que contém a amostra, nunca na tampa, evitando identificar sobre códigos de barras.

2.2 Aspectos básicos da coleta e do transporte de amostra

2.2.1 Coleta

Quem coleta o material deve ser devidamente treinado e periodicamente reciclado nessa atividade, principalmente nos seguintes quesitos:

- Saber que o material deverá ser encaminhado ao laboratório o mais breve possível.
- Ter conhecimento sobre o transporte do material e sua conservação e sobre as providências caso o exame não possa ser realizado imediatamente.
- Ser informado sobre o risco biológico presente e quais equipamentos de proteção individual (EPI) deve utilizar.
- Conhecer os procedimentos em caso de acidente, evitando exposição ao material biológico e à contaminação do ambiente.

Considerações gerais da coleta microbiológica

- Colher antes da antibioticoterapia, sempre que possível.
- Quando a terapia antimicrobiana já tiver sido instituída, coletar sangue ou urina imediatamente antes da próxima dose do antimicrobiano.
- Instruir claramente o paciente sobre o procedimento.
- Observar a antisepsia na coleta de todos os materiais clínicos.
- Colher do local onde o micro-organismo suspeito tenha maior probabilidade de ser isolado, priorizando tecidos vitalizados, e nunca tecidos necróticos ou materiais purulentos acumulados na lesão.
- Considerar o estágio da doença na escolha do material. Por exemplo: patógenos entéricos causadores de diarreia estão presentes em maior quantidade e são mais facilmente isolados durante a fase aguda ou diarreica do processo infeccioso intestinal.
- Quantidade suficiente de material deve ser coletado para permitir uma completa análise microbiológica. Caso a quantidade seja pequena, priorizar os exames de maior relevância.
- O pedido do exame e o frasco contendo material devem conter as informações descritas no módulo anterior (ver requisição de exame).

Considerações de segurança

- Utilizar as barreiras de proteção necessárias a cada procedimento.
- Toda amostra deve ser tratada como potencialmente patogênica.
- Usar frascos e meios de transporte apropriados.
- Não manusear a amostra em trânsito, do local de coleta ao laboratório.
- Não contaminar a superfície externa do frasco de coleta e verificar se ele está firmemente vedado (caso ocorram respingos ou contaminação na

parte externa do frasco, fazer descontaminação com álcool 70% ou outra solução descontaminante disponível).

- Não contaminar a requisição médica que acompanha o material.
- As amostras deverão ser transportadas em sacos plásticos fechados.
- Evitar transportar aspirados em seringas com agulha.
- Encaminhar os materiais imediatamente ao laboratório.

2.2.2 Transporte das amostras

- Sempre que necessário, consultar o laboratório para verificar a disponibilidade dos meios de transporte.
- As amostras devem ser transportadas imediatamente ao laboratório para:
 - Assegurar a sobrevivência e isolamento do micro-organismo, pois o laboratório de microbiologia trabalha basicamente em função da viabilidade dos micro-organismos.
 - Evitar o contato prolongado dos microorganismos com anestésicos ou anticoagulantes utilizados durante a coleta, pois eles poderão exercer atividade bactericida.

Tempo crítico para entrega da amostra ao laboratório e meios de transporte

Amostra	Tempo crítico	Temperatura	Meio de transporte
Anaeróbios	30 minutos	Ambiente	Fragmento ou aspirado em frasco estéril, meio de transporte semi-sólido
Fezes	1 hora	Ambiente	Frasco seco estéril
	12 horas	Ambiente	Meio Cary Blair ^c
Fragmentos	30 minutos	Ambiente	Frasco estéril
	8 horas	Ambiente	Meio de transporte
Líquido pleural	Imediatamente	Ambiente	Tubo seco estéril
Líquor	Imediatamente	Ambiente	Tubo seco estéril
Material respiratório	30 minutos	Ambiente	Tubo seco estéril
Sangue	1 hora	Ambiente ^b	Passar para caldo nutriente imediatamente após a coleta
Swab ^a	Até 8 horas	Ambiente	Meio semi-sólido (Stuart ou Amies)
Urina	1 hora	Ambiente	Frasco seco estéril
	12 horas	Refrigerada	Frasco seco estéril

^a Evitar *Swab* transportado em tubo seco estéril pois o tempo de espera pode levar ao ressecamento excessivo do material e perda da viabilidade de alguns micro-organismos.

^b Para rotinas automatizadas, não incubar o frasco em estufa comum, deixar em temperatura ambiente até incubação no equipamento.

^c Meio Cary Blair para transporte de fezes, com pH 8,4, apresenta boa recuperação para *Vibrio* sp. e *Campylobacter* sp. Se a amostra não for entregue no laboratório em uma hora, conservar em geladeira de -4 a 8 °C, no máximo por um período de 12 horas. Marcar a data e horário da coleta.

2.2.3 Critérios de rejeição para amostras clínicas

O recebimento criterioso das amostras clínicas pelo laboratório de microbiologia garante uma melhor correlação clínico/laboratorial.

Desse modo, devem existir normas de rejeição para determinados materiais e condições que, quando detectados, tornam necessário o contato com o médico solicitante para melhores esclarecimentos, ou solicitação de nova amostra dentro dos critérios de aceitação.

Erros de identificação

- Discrepância entre a identificação da amostra e o pedido médico.
- Falta de identificação da amostra.
- Origem da amostra ou tipo de amostra não identificada.
- Teste a ser realizado não especificado.

Amostras inadequadas por fornecerem resultados questionáveis

- Culturas para anaeróbios recebidas em condições não apropriadas de anaerobiose.
- Frascos não estéreis.
- Material colhido em frascos não padronizados ou de origem desconhecida.
- Material colhido em *swab* não padronizado ou de origem desconhecida (“cotonete”).
- Material de colostomia.
- Mais de uma amostra de urina, fezes, escarro, ferida colhida no mesmo dia e da mesma origem.
- Material clínico recebido em solução de fixação (formalina).
- Material conservado inadequadamente com relação à temperatura (urinas colhidas há mais de 24 horas, que ficaram guardadas em geladeira, ou colhidas há mais de duas horas, sem refrigeração).
- Ponta de cateter de Foley.
- *Swab* de abscesso peri-retal^a.
- *Swab* de amostra de queimadura^a.
- *Swab* de lesão de gangrena^a.
- *Swab* de lesão periodontal^a.
- *Swab* de úlcera de decúbito^a.
- *Swab* de úlcera varicosa^a.
- *Swab* seco.

^a Somente processar biópsia ou punção aspirativa

- *Swab* único com múltiplas requisições de testes microbiológicos.
- Vômito.
- Aspirado gástrico de recém-nascido^b.

2.3 Instruções para hemoculturas

- Para diagnóstico de infecção sistêmica coletar hemocultura preferencialmente por punção venosa periférica.
- A técnica de coleta de sangue através de cateteres deve ser utilizada somente para o diagnóstico de infecções relacionadas ao dispositivo e deverá sempre ser acompanhada de uma amostra de sangue periférico.
- Os métodos automatizados costumam revelar as amostras positivas em 70 a 80% dos casos nas primeiras 48 horas.
- Punções arteriais não trazem benefícios na recuperação dos micro-organismos.
- Não se recomenda a troca de agulhas entre a coleta e a distribuição do sangue nos frascos específicos.

Fatores que influenciam diretamente os resultados de hemoculturas:

- Volume de sangue coletado por frasco:
 - **O volume** ideal de sangue corresponde a 10% do meio de cultura do frasco (proporção sangue: caldo de cultura de 1:5 a 1:10, dependendo da metodologia utilizada). Quanto maior o **volume de sangue** inoculado no meio de cultura, melhor a recuperação de micro-organismos. Entretanto, excesso de sangue, em desproporção com o meio pode inibir o crescimento de micro-organismos. Assim, frascos que possibilitem uma coleta de até 10 mL são os mais indicados, totalizando 20ml por punção, distribuídos pelo número de frascos preconizados, ou seja, um par de frascos por punção / amostra.
 - Coletar o máximo volume permitido para cada frasco (cada mL a mais representa cerca de 3% de chance de isolamento do agente etiológico). Ex: para adulto a coleta de 10mL no lugar de 5mL representa 15% a mais de chance de isolamento.
 - Para crianças, o volume ótimo de sangue ainda não está bem definido, mas dados da literatura demonstram que há uma relação direta entre o volume de sangue obtido e a detecção de infecção, – indicando que amostras de sangue com volume maior ou igual a 1 mL detectaram mais bacteremias que amostras com volumes inferiores a 1 mL. De acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute – Blood Cultures IV, 2007*) o volume de sangue extraído em crianças deveria ser de até 1% da volemia. Entretanto, os

^b Apenas para avaliar possível colonização por *S. agalactiae* em caso de bolsa rota.

estudos de Kellogg e col. em 2000 – baseiam-se na premissa de que até 4 a 4,5% da volemia caracteriza um índice seguro e na relação entre volemia e peso do paciente. Dessa forma, as recomendações para coleta em crianças estão resumidas na tabela a seguir. Porém, de forma prática, ainda é impossível estabelecer volumes ótimos para crianças muito pequenas ou prematuras.

Volume de sangue sugerido para hemoculturas de lactentes e crianças

Peso (Kg)	Volemia (mL)	Volume de sangue por amostra (mL)		Volume total de sangue (mL)	% da volemia
		Cultura nº 1	Cultura nº 2		
<=1	50 – 99	2	-	2	4
1,1 – 2	100 – 200	2	2	4	4
2 – 12,9	>200	4	2	6	3
13 – 36	>800	10	10	20	2,5
>36	>2.200	20	20	40	1,8

Adaptado de: Baron, E.J, M.P. Weinstein, W.M.Dunne Jr, P. Yagupsky, D.F. Welsh e D.M. Wilson. *Cumitech 1C, Blood Cultures IV*. Coordinating Ed. E.J. Baron. ASM Press, 2005. Washington D.C. (2).
 Kellogg, J.A. Manzella, J.P. e D.A. Bankert. *Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age*. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38:2181-2185 (18).

Tipos de frascos e volume de sangue sugeridos por amostra de hemocultura

	Crianças até 13 kg	Crianças de 13 a 36 kg	Crianças > 36 kg e Adultos
Frasco AERÓBIO ^a	1 a 4 mL ^b	5 mL	5 a 10 mL
Frasco ANAERÓBIO ^a	-	5 mL	5 a 10 mL
Volume total/amostra	1 a 4 mL ^b	10 mL	20 mL

^aVer recomendações do fabricante

^bEm lactentes com extrema dificuldade de coleta pode-se coletar um volume não inferior a 0,5ml.

Observação: a capacidade dos frascos pediátricos é em geral de até 4 mL e de adulto até 10mL de sangue (verificar o produto em uso e recomendações do fabricante).

- Anticoagulante
 - Recomenda-se o SPS (Polianetolsulfonato sódico). A heparina pode apresentar efeito tóxico sobre alguns micro-organismos mais sensíveis.
- Temperatura de conservação.
 - Os frascos de hemocultura devem ser utilizados em temperatura ambiente e mantidos até o momento da incubação, não refrigerar.
- Coleta asséptica
 - A execução de técnica adequada de antissepsia reduz os riscos de contaminação de hemocultura e facilita a interpretação dos resultados obtidos.
- Momento da coleta

- Colher antes da administração de antibióticos.
- Caso haja terapia antimicrobiana em curso, priorizar o momento anterior à administração da droga.
- Lembrar que o pico febril é o momento de maior destruição microbiana, podendo dificultar a recuperação de organismos viáveis, assim dar preferência à coleta logo que detectado início de episódio febril.
- Ao coletar amostras pareadas de hemocultura de cateter com amostra de veia periférica, coletar em **momentos próximos e volumes iguais**, para diferenciar infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter da infecção da corrente sanguínea relacionada a outros focos de infecção, através da determinação do tempo de positividade.
- Número de amostras e local
 - Recomenda-se **pelo menos duas e não mais que quatro** amostras de sangue para hemocultura para aumentar a positividade e facilitar a interpretação dos resultados. Cada amostra compreende **um par de frascos por punção venosa**, sendo 20mL o volume ideal para adultos, por punção.
 - Mais de 4 amostras (exceto nos casos de endocardite) não acrescentam sensibilidade e podem contribuir para o desenvolvimento de anemia pelo paciente e gasto desnecessário de insumos.
 - Em caso de sepsis, febre a esclarecer, pneumonia, meningite, ou em paciente neutropênico: coletar em seguida 2 até 3 amostras, em dois ou três locais diferentes, antes do início da antibioticoterapia.
 - Paciente com cateter de longa permanência: coletar uma amostra de cada via do cateter (discriminando nos frascos de hemocultura de qual via foi colhido), concomitantemente com uma amostra de hemocultura periférica.
 - Paciente neutropênico com febre a esclarecer: coletar duas amostras periféricas de locais diferentes. Se estiver com qualquer tipo de cateter é aconselhável coletar uma terceira amostra pelo cateter ou no mínimo uma amostra periférica e outra de cada via de cateter.
 - Endocardite: coletar 2 a 3 amostras de locais diferentes. Se negativas após 24 a 48 horas de incubação, coletar pelo menos mais duas amostras.
 - Coletar as amostras de hemocultura preferencialmente de membros superiores. Em caso de coleta em outro local, reforçar a antisepsia.
 - Não se recomenda a coleta de uma única amostra de hemocultura devido a dificuldade na interpretação de contaminantes.
 - A sensibilidade da coleta por cateter venoso quando comparada com a periférica é de 75 a 95%, mas a especificidade é mais baixa, entre 65 a 75%. Em compensação, o valor preditivo negativo é alto (> 90%), podendo ser útil para afastar o diagnóstico de infecção relacionada a cateter vascular.
 - Recomenda-se que, preferencialmente, as hemoculturas de rotina incluam frascos pareados de hemocultura aeróbia e anaeróbia para cada amostra ou punção, pois a coleta do par incluindo o frasco anaeróbio leva ao aumento do iso-

lamento de *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, alguns *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., anaeróbios estritos e facultativos, além de garantir volume de sangue mais adequado de amostra por punção para melhor recuperação dos patógenos.

- Grande parte dos meios comerciais disponíveis é capaz de detectar o crescimento de leveduras no frasco aeróbio.
- Quando a amostra obtida possuir volume total inferior ao preconizado por frasco, o maior volume de sangue deve ser inoculado no frasco aeróbio para que não haja perda na detecção de bacteremias causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou leveduras, que são aeróbios estritos. O menor volume restante deve ser inoculado no frasco anaeróbio.

2.3.1 Material para realizar a coleta

- garrote,
- algodão ou gaze,
- antissépticos: álcool 70% e clorhexidine alcoólico ou PVP-I alcoólico,
- frasco de hemocultura,
- agulha e seringa (ou conjunto de escalpe e dispositivo de coleta a vácuo),
- luvas de procedimento.

Observação: não há necessidade de uso de máscara, exceto se indicado para paciente em isolamento.

2.3.2 Técnica para coleta

A antissepsia adequada da pele é parte fundamental do processo e é o fator que determina a probabilidade de uma hemocultura positiva ser considerada contaminação ou infecção. Os dados disponíveis até o momento mostram que a tintura de iodo 1-2% (álcool iodado) ou preparações com clorexidine alcoólico 0,5% parecem ser equivalentes entre si e ambos apresentam menores taxas de contaminação do que preparações de iodo-povidine (PVPI) (23). Clorexidine tem a vantagem de ser incolor e menos irritante para a pele. Recomenda-se que, devido à possibilidade de toxicidade, seja feita a remoção desses antissépticos com álcool da pele de neonatos após a coleta ou utilizar apenas álcool 70%.

De acordo com a padronização de antissépticos de cada instituição, o seguinte roteiro para coleta pode ser proposto:

1. Lavar as mãos com água e sabão.
2. Preparar o material, dispor a etiqueta de identificação no frasco, anotando o nome do paciente, leito, data, hora e local de coleta (sítio anatômi-

co), imediatamente ao procedimento. **ATENÇÃO:** *Não colar a etiqueta de identificação sobre o código de barras do frasco.*

3. Limpar a tampa de borracha com algodão embebido em álcool 70%. Manter o algodão sobre o frasco até o momento da punção ou proceder conforme as instruções do fabricante.
4. Escolher o melhor local de punção para a coleta de sangue. Colocando o garrote e apalpando livremente as veias do paciente para escolher a mais calibrosa e menos móvel. Soltar o garrote.
5. Fazer a antissepsia com clorexidine alcoólico 0,5%, friccionando a pele em círculos semiabertos a partir do ponto a ser puncionado. Secar por 30 segundos. Em seguida, aplicar novamente clorexidine alcoólico 0,5% utilizando novo algodão ou gaze. Esperar cerca de 30 segundos para secar, repetir o procedimento por mais uma vez e aguardar secar.
Nota: clorexidine alcoólico para limpeza da pele pode ser substituído por álcool-iodado ou álcool 70%, dependendo da padronização da instituição. Não voltar a tocar o local onde foi feita antissepsia, a não ser com luvas estéreis (se necessária nova palpação do local). Se houver suspeita de contaminação da área, repetir o procedimento de antissepsia.
6. Colocar novamente o garrote e puncionar a veia com agulha e seringa ou dispositivo para coleta a vácuo, sem tocar diretamente no local de punção.
7. Coletar de 5 a 10ml de sangue (adultos) ou de 1 a 4ml de sangue (crianças) para cada frasco. Para crianças ver tabela da pág. 18.
8. Ao retirar a agulha, fazer compressão local com algodão seco, sem flexionar o braço.
9. Transferir a amostra para os frascos de hemocultura, colocando primeiramente o sangue no frasco ANAERÓBIO (sem troca de agulhas). Se a coleta for realizada com escalpe e adaptador próprio (sistema de coleta fechado a vácuo), inocular primeiro o frasco AERÓBIO. Importante lembrar que, nesse caso, os frascos de hemocultura devem permanecer em pé durante toda a etapa de coleta, para evitar refluxo para a veia do paciente. Observar o volume correto observando a guia de marcação na etiqueta do próprio frasco, já que a maioria deles não tem volumes de aspiração a vácuo calibrados. Utilizar um conjunto de seringa – agulha ou dispositivo próprio de coleta a vácuo para cada punção/amostra.
10. Dispensar o material de punção em local apropriado (caixa de perfurocortante).
11. Lavar as mãos.

Se a amostra for obtida a partir de cateter vascular, deve ser realizada a antissepsia do local a ser puncionado com álcool 70% (dispositivo) ou clorexidine alcoólico (pele) conforme instruções acima. Não é necessário descartar o vo-

lume inicial de sangue ou lavar o acesso com salina para eliminar heparina ou outros anticoagulantes, pois a alta concentração proteica dos meios de cultura normalmente neutraliza o efeito antimicrobiano eventual do anticoagulante.

Além disso, o descarte do volume inicial de sangue do cateter com o intuito de evitar contaminação é assunto controverso e essa prática ainda é realizada em muitas instituições, mesmo nas pediátricas, onde o volume de sangue é ponto crítico. Porém, estudo realizado por – Dwivedi e col., em 2009, demonstrou que o descarte da alíquota inicial não diminui a chance de contaminação da amostra, tornando essa prática desnecessária.

2.3.3 Transporte

- Nunca refrigerar o frasco.
- Manter o frasco em temperatura ambiente e encaminhar o mais rápido possível para o laboratório.

2.4 Instruções para ponta de cateter intravascular

2.4.1 Indicação

A coleta de ponta de cateter vascular central é indicada somente nos casos de suspeita clínica de infecção sanguínea relacionada ao cateter e obrigatoriamente deve ser acompanhada de uma amostra de hemocultura periférica.

Esse tipo de coleta viabiliza a identificação de micro-organismos na parte externa do cateter e é realizada por cultura semiquantitativa através do método de Maki.

2.4.2 Técnica de retirada da ponta ou segmento de cateter

- Lavar as mãos e calçar luvas de procedimentos.
- A pele ao redor do cateter deve ser cuidadosamente desinfetada com solução iodada ou de clorexidina. Após a secagem da solução sobre a pele (cerca de 30 segundos a 1 minuto), o cateter é removido cuidadosamente. O excesso de antisséptico sobre a pele pode ser removido, ao final, com álcool 70%.
- O segmento distal (que estava inserido na veia do paciente), de aproximadamente 5 cm, é assepticamente cortado com auxílio de tesoura estéril, colocado em um frasco estéril seco, e remetido em um prazo mínimo (1 hora) ao laboratório.

- Para cateteres de longa permanência com infecção do tecido subcutâneo associada, coletar a parte do cateter do segmento transcutâneo ou *swab* do local e a porção distal. Colocar em frascos distintos com a identificação da parte do segmento colhido.

2.5 Instruções para secreção traqueal

A coleta desse material é realizada em pacientes intubados, através de sonda de aspiração.

- Coletar em frasco estéril de preferência com sistema de sucção acoplado ao frasco e enviar imediatamente ao laboratório. Não processar *swab* traqueal como aspirado traqueal. *Swab* pode ser útil apenas para avaliar colonização local para fins epidemiológicos e não para diagnóstico de infecção.
- Para definir a etiologia de pneumonias hospitalares deve se cultivar o material de forma quantitativa, com diluições em solução fisiológica. Sendo o ponto de corte a ser considerado o de 1.000.000 UFC / mL. Em geral a amostra do paciente é colhida diluída em 1:10 de salina estéril. *Vide* considerações no Módulo 1 trato respiratório inferior.

2.6 Instruções para lavado bronco-alveolar (BAL)

Recomendado para o diagnóstico etiológico das pneumonias associadas a ventilação mecânica e em paciente imunodeprimidos, sendo considerado o método mais fidedigno para investigação microbiológica do trato respiratório inferior.

O valor preditivo positivo de contagens superiores a 10^4 UFC/mL apresenta maior significado, sendo o ponto de corte sugerido para distinguir colonização de infecção.

O tempo do transporte da amostra é essencial, devendo estar em torno de 30 minutos. Nunca ultrapassar 2 horas, pois há multiplicação bacteriana nesse material.

A coleta deve ser feita preferencialmente antes de biópsias, para se evitar excesso de sangue.

Esse procedimento deve ser realizado por equipe médica especializada:

Colher as alíquotas em recipientes distintos:

- A primeira alíquota deverá ser colocada em frasco identificado como primeira amostra (utilizada para esfregaços microbiológicos).

- Todas as outras amostras poderão ser coletadas em um único frasco estéril (POOL). Somente essas amostras deverão ser utilizadas para a cultura quantitativa, evitando falsas contagens.

Para cultura de *Legionella* colher o LBA com água destilada estéril.

Esse material poderá ser útil também para pesquisa de *Pneumocystis jirovecii* e vírus respiratórios.

- **Escovado brônquico**

- Atualmente raramente colhido; a escova deverá ser colocada em solução de Ringer Lactato e rapidamente encaminhada ao Laboratório.

- **Biópsia pulmonar**

- Colher em frasco estéril, podendo adicionar 1 a 2ml de salina estéril.
- Enviar rapidamente ao laboratório.

Observação:

Coletar tecido pulmonar, aspirado transtraqueal, aspirado percutâneo, aspirado transcutâneo e lavado brônquico via cateter protegido. Utilizar frascos de transporte adequado para anaeróbios.

2.7 Instruções para coleta de secreção de orofaringe

A contaminação com saliva, que contém uma flora bacteriana variada, pode dificultar o isolamento do verdadeiro agente infeccioso.

As amostras devem ser cultivadas para recuperação do *Streptococcus pyogenes* e de outros agentes de faringite bacteriana como estreptococos beta-hemolíticos dos grupos C e G e *Arcanobacterium haemolyticum*.

- Solicitar ao paciente que abra bem a boca.
- Raspar a mucosa com *swab* sobre as amígdalas e faringe posterior, usando abaixador de língua.
- Evitar tocar na língua e na mucosa bucal.
- Procurar o material nas áreas com hiperemia próximas aos pontos de supuração ou remover o pus ou a placa, colhendo o material abaixo da placa.
- Coletar a amostra exatamente na área inflamada, evitando outros sítios na cavidade oral.
- Colher dois *swabs*, um para confecção imediata da lâmina de bacterioscopia e outro para o cultivo, transportado em meio de transporte adequado (Stuart).

2.8 Instruções para fluidos orgânicos estéreis

Procedimento realizado por equipe médica especializada, utilizando técnica antiséptica de coleta.

- Proceder a antissepsia no sítio da punção com clorexidina alcoólica álcool 70% ou solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI 10%), que deverá ser removida após o procedimento com álcool 70% para evitar queimadura ou reação alérgica.
- Coleta de líquidos orgânicos como: líquido pleural, ascítico, de articulações e pericárdico.
- Obter a amostra através de punção percutânea ou cirúrgica.
- Proceder a antissepsia no sítio da punção com álcool 70% e com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI 10%), que deverá ser removida após o procedimento com álcool 70% para evitar queimadura ou reação alérgica. Pode-se também usar clorhexidina alcoólica.
- Quanto maior o volume da amostra, maior a probabilidade de isolamento do agente etiológico.
- Encaminhar o líquido coletado em frasco seco e estéril ou inoculado diretamente nos frascos do equipamento de automação de hemoculturas, respeitando a proporção entre material e meio de cultura de no máximo 1 parte de líquido em 9 partes de meio de cultura (1:10). Nesse caso, reservar volume para a confecção da lâmina para microscopia ou para outros exames (citológico, sorológico, etc.).
- Transportar imediatamente ao laboratório, com a orientação do tipo de cultura (aeróbia, anaeróbia, fungos, micobactérias, etc.) necessariamente especificada no pedido médico.

2.8.1 Líquor

Procedimento realizado por equipe médica especializada, com técnica asséptica, da mesma forma que descrita acima.

- Recomenda-se jejum.
- Caso a coleta permita somente a disponibilidade de um tubo, o laboratório de microbiologia deverá ser o primeiro a manipulá-lo.
- Nunca refrigerar a amostra.
- Transportar a amostra imediatamente ao laboratório, acompanhada de pedido médico adequadamente preenchido.
- Os exames a serem realizados devem ser especificados e priorizados de acordo com o volume coletado.

2.8.2 Instruções para feridas, abscessos e exsudatos

O termo “secreção de ferida” não é apropriado como informação da origem do material coletado. O sítio anatômico específico, bem como as informações adicionais (material de ferida superficial ou profunda), são extremamente valiosos para o laboratório, auxiliando na interpretação dos resultados.

- As margens e superfície da lesão devem ser descontaminadas com solução de PVPI aquoso e soro fisiológico (metade/metade).
- Proceder à limpeza com solução fisiológica.
- Coletar o material purulento localizado na parte mais profunda da ferida, utilizando-se, de preferência, aspirado com seringa e agulha. Quando a punção com agulha não for possível, aspirar o material somente com seringa tipo insulina.
- *Swabs* (menos recomendados) serão utilizados quando os procedimentos acima citados não forem possíveis.
- A escarificação das bordas após antisepsia pode produzir material seroso que é adequado para cultura.

Observações:

- A descontaminação da superfície das lesões ou abscessos abertos, antes da coleta do material, é crítica para interpretação do resultado.
- Não coletar o pus emergente. O material das margens da lesão, a região livre de necrose e a parte mais profunda do sítio escolhido são mais representativos e possuem maior viabilidade de micro-organismos.
- Caso não se consiga colher o exsudato, orienta-se a remoção de crostas e a coleta do material imediatamente abaixo, nunca das lesões secas ou crostas.
- A coleta de ferida de queimadura deve ser realizada após extensa limpeza e debridamento da lesão. Nesse caso, a biópsia da pele é a técnica mais recomendada.

2.8.3 Cultura para anaeróbios de secreções de feridas e abscessos

- Aspirar o material com agulha e seringa após descontaminação da superfície com PVPI aquoso a 10%, deixando em contato com a superfície por um minuto. Quando não houver indicação do uso do PVPI fazer lavagem abundante com salina estéril.
- Quando o uso de agulha for contraindicado, aspirar o material com cateter plástico flexível ou diretamente com seringa, sem agulha.

2.9 Instruções para amostras de pele e tecido subcutâneo em queimadura

- A superfície da ferida de queimadura estará colonizada pela microbiota do próprio paciente e/ou pelos micro-organismos do meio ambiente em que se encontra. A cultura superficial pode levar a erros e é desaconselhável. Portanto, biópsia de tecido profundo é o mais indicado.
- Os micro-organismos não ficam distribuídos somente na ferida queimada. Por isso, recomenda-se coletar amostras de áreas adjacentes à queimadura.
- Quando possível desinfetar a superfície com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI a 10%), que deverá ser removida com álcool 70% para evitar queimadura e reação alérgica.
- No caso de pacientes queimados e áreas cruentas usar solução aquosa de PVPI a 10% e solução fisiológica.
- Deixar secar antes de coletar a amostra.
- Coletar amostra de punção ou biópsia (3 mm a 4 mm) para cultura.

2.10 Instruções para biópsia da pele

- Descontaminar a superfície com punção com clorexidina alcoólica álcool 70% ou solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI 10%), que deverá ser removida após o procedimento com álcool 70% para evitar queimadura ou reação alérgica.
- Procedimento médico, coletar 3 mm a 4 mm de diâmetro da amostra, abrangendo planos profundos, na medida do comprometimento do processo infeccioso investigado.
- Colocar num recipiente estéril, **sem formalina**, sem outros conservantes, fornecido pelo laboratório.

2.11 Instruções para biópsias de gânglios e amostras cirúrgicas

- O material deverá ser obtido em condições assépticas.
- Deverá ser representativo da lesão e em quantidade suficiente para pesquisas (colorações e exame direto), culturas (bactérias, fungos, micobactérias, protozoários ou amebas e eventualmente vírus) e parte do material deverá ser fracionada **em outro recipiente com conservante apropriado (formol) para exame histopatológico**.
- Transporte em frasco estéril com 1 mL de salina estéril em até 2h para o Laboratório. Não enviar apenas pus, mas a parte da lesão ativa ou parede da lesão ou do abscesso.
- No caso de punção aspirativa, mesmos cuidados de antisepsia, aspirar com seringa e enviar em frasco estéril imediatamente ao Laboratório sem conservantes.

2.12 Instruções para tecido ósseo

- Obter amostra óssea representativa através de biópsia ou curetagem com cuidados de antissepsia.
- Colocar num recipiente estéril contendo NaCl 0,85% estéril (solução fisiológica).
- Transporte rápido ao Laboratório.
- Não usar formalina.

2.13 Instruções para lesões superficiais – coleta para fungos – micológico direto

- Limpar a superfície da pele com álcool a 70%; não utilizar iodo. Recomenda-se não lavar a lesão com sabões antissépticos no dia da coleta, não utilizar cremes hidratantes ou talco.
- Usando um bisturi, com lâmina estéril, raspar as bordas ativas da lesão. A coleta de material da área central pode ser causa de resultados falso-negativos.
- Amostra do couro cabeludo inclui cabelo, que é seletivamente coletado para exame (aqueles que apresentem características de tonsura, quebradiços) sendo arrancado pela raiz.
- Amostra de unha – obter raspado e/ou material abaixo da unha, utilizando se bisturi com lâmina estéril. Deve-se retirar o esmalte pelo menos um dia antes da coleta – remanescentes de esmalte ou acetona podem interferir no crescimento fúngico em casos de solicitação de cultura para fungos.
- Os materiais obtidos podem ser colocados em placa de Petri estéril e identificados separadamente para cada sítio a ser investigado (por exemplo, unha da mão direita, raspado do pé esquerdo, raspado da região plantar, etc.).
- Transportar as amostras ao laboratório em temperatura ambiente. Não se recomenda a conservação sob refrigeração.

2.14 Instruções para secreção de ouvido

- Conduto auditivo externo e médio.
 - Remover secreção superficial com um *swab* umedecido em salina estéril e com outro *swab* obter material fazendo rotação no canal.
 - Inserir, em seguida, o *swab* no meio de transporte (Stuart), repetir o procedimento com um segundo *swab* para a confecção de lâmina para microscopia.
- Conduto auditivo interno
 - Membrana timpânica rompida: o médico deve proceder como no item anterior e com espéculo ou cone de otoscópio.
 - Coletar material com *swab* e em seguida inserir no meio de transporte.
 - Com outro *swab*, fazer esfregaço para coloração Gram.
 - Membrana íntegra: procedimento médico: usar seringa para puncionar a membrana ou sistema apropriado para aspiração e coletor, que deverão ser encami-

nhados imediatamente ao laboratório para processamento ou introduzir em meio de transporte para conservação e fazer lâmina para bacterioscopia.

2.15 Instruções para secreção ocular

- As culturas deverão ser coletadas antes da aplicação de antibióticos, soluções, colírios ou outros medicamentos.
- Desprezar a secreção purulenta superficial e, com *swab*, colher o material da parte interna da pálpebra inferior. Encaminhar ao laboratório em meio de transporte apropriado.

2.16 Coleta de material urogenital

2.16.1 Instruções para material genital

- O Laboratório de Microbiologia pode processar material de trato genital para os seguintes grupos de patologias:
 - uretrites, vaginites e vaginoses, cervicites e endocervicites, prostatites e infecções de glândulas anexas;
 - úlceras e outras lesões genitais;
 - material obtido por procedimento cirúrgico, incluindo material endometrial, líquido amniótico, aspirado de abscessos tubo-ovarianos, etc.
 - Antes da coleta de material, o médico deverá conhecer os principais patógenos envolvidos no processo infeccioso investigado e a respectiva disponibilidade de recursos diagnósticos, condições de coleta, meios de transporte e adequado preenchimento da solicitação de exames.

Amostras e sítios genitais indicados e não indicados para cultura de anaeróbios

Não indicados Trato feminino	Não indicados Trato masculino	Indicados para o Cultivo de Anaeróbios Trato feminino:
Endocérnix	Uretra	Placenta (origem de cesárea)
Vagina	Fluido prostático	Endométrio
Uretra	Fluido Seminal	Aspirado cervical
Vulva		Aspirado de abscesso tubo-ovariano
Genital externo feminino		Aspirado de glândulas de Bartholin
Períneo		

Observações:

- A seleção de materiais genitais bem como sua coleta adequada são fatores importantes na interpretação dessas culturas, uma vez que esses locais possuem uma quantidade grande de micro-organismos comensais.

- Culturas vaginais de rotina não são indicadas pelo motivo acima exposto.
- Culturas anaeróbias são limitadas a certos materiais, conforme tabela anterior.

Muitos agentes de infecção genital em mulheres são limitados a certos sítios anatômicos, conforme tabela a seguir.

Amostra a ser coletada	Exames realizados	Material necessário para coleta
SECREÇÃO VAGINAL	Bacterioscopia	Swab seco para duas lâminas
	Cultura para fungo/aeróbio	Swab com meio de transporte
SECREÇÃO ENDOCERVICAL	Bacterioscopia	Swab seco para duas lâminas
	Cultura para micoplasma e ureaplasma	Meio de transporte específico
	PCR para Chlamydia	Meio de transporte específico
	PCR para HPV	Meio de transporte específico

- Nos casos de suspeita de infecção por *Chlamydia trachomatis* deverá ser solicitado exame por imunofluorescência ou por biologia molecular (PCR).
- Pode ocorrer associação entre infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoea*.
- Material purulento, proveniente da glândula de Bartholin, poderá ser obtido diretamente do ducto, após massagem digital ou colhida através de seringa.
- Endométrio: esse tipo de material é melhor coletado por curetagem. Recomenda-se o uso de swabs protegidos para coleta via cérvix, para evitar contaminação com a flora vaginal.
- DIP (Doença Inflamatória Pélvica): o material é coletado por técnica invasiva. O líquido peritoneal pode ser coletado por aspiração do fundo de saco vaginal (culdocentese). Material retirado diretamente dos ovários ou trompas é coletado (aspirado com seringa) no ato cirúrgico.
- Vulva: raspados, aspirados ou biópsia não têm muito valor para cultura a não ser em casos de suspeita de sífilis ou fungos ou parasitas.
- Nos casos de suspeita de sífilis, a lesão deverá sofrer uma abrasão cuidadosa com gaze seca até que um fluido seroso comece a fluir, tomando cuidado para evitar sangramento, o que acarreta interferência no exame em campo escuro. Após o acúmulo de fluido seroso, colocar uma gota em uma lâmina limpa e examinar imediatamente utilizando o microscópio com condensador de campo escuro.
- DIU (Dispositivo Intra-Uterino): deve ser removido pelo médico evitando-se contaminação cervical ou vaginal. Coloque todo o DIU dentro de um recipiente estéril para ser transportado para o laboratório.

- Cultura semiquantitativa para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* podem ser realizadas com kits comercializados. Consultar o laboratório para maiores informações.
- Infecções por *Chlamydia trachomatis*: não aceitar secreção vaginal para pesquisa de *Chlamydia*, uma vez que esse micro-organismo não pode crescer nas células epiteliais escamosas da vagina. A *Chlamydia* é parasita intracelular obrigatório do epitélio colunar do cérvix.
- Realizar coleta de material endocervical, raspando-se o endocérvix para obter células.
- O swab deverá ser inoculado imediatamente em meio de transporte especial ou preparar as lâminas para coloração especial.
- Detecção de estreptococos do grupo "B" em mulheres: culturas cervicais não são aceitáveis e não se devem utilizar espéculos. Sugere-se coleta com swab do intróito vaginal e outro do orifício ano-retal. Os swabs devem ser colocados em meio de transporte específico: caldo Todd Hewitt.
- Secreção prostática: poderá ser coletada após massagem digital pelo reto, podendo ser acompanhada de amostras de urina pré e pós-massagem. O material ejaculado também poderá ser submetido à análise.
- Na suspeita de *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres, a cultura é o método de escolha, sendo o material coletado do endocérvix. O encaminhamento deve ser feito em meio de transporte ou plaqueado imediatamente em ágar seletivo (Thayer-Martin ou similar ou ainda ágar chocolate) e mantidos em atmosfera de 5% de CO₂.

2.16.2 Secreção cervical e vaginal

Preparo da paciente

- Recomenda-se:
 - Não estar menstruada.
 - Evitar ducha e cremes vaginais na véspera da coleta.
 - Desejável três dias de abstinência sexual.

Coleta vaginal

- Inserir um espéculo (lubrificado somente por usar água morna) na vagina.
- Retirar o excesso de muco cervical com swab de algodão.
- Inserir os swabs indicados, rodar por alguns segundos sobre o fundo do saco, retirar e voltar aos meios indicados: meio de Stuart para bactérias e fungos. Utilizar o caldo Todd-Hewitt para pesquisa de *S. agalactiae* de amostra do introito vaginal.
- Swab seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.

Coleta endocervical

- Inserir um espéculo na vagina e retirar o excesso de muco cervical com *swab* de algodão.
- Inserir os *swabs* indicados no canal endocervical até a ponta do *swab* não ser mais visível.
- Rodar por alguns segundos, retirar evitando o contato com a parede vaginal, voltar aos meios indicados:
 - Mycoplasma/Ureaplasma – mergulhar o *swab* dentro da solução do tubo fornecido e agitar. Remover o *swab* e identificar o tubo.
 - *Swab* do meio de transporte específico para *Chlamydia trachomatis* – mergulhar o *swab* dentro da solução do tubo fornecido e agitar vigorosamente. Comprimir o *swab* contra a parede do tubo. Qualquer excesso de muco deve ser retirado da amostra. Remover o *swab* e identificar o tubo.
 - *Swab* para inserir no meio de transporte de Stuart para cultura de *N. gonorrhoeae*.
 - *Swab* seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.

Cultura para anaeróbios do trato genital feminino

- Descontaminar o canal cervical com *swab* embebido de PVPI aquoso a 10%.
- Coletar amostra do trato genital superior de forma a obter material celular da parede uterina.
- Amostras coletadas por laparoscopia, culdocentese ou cirurgia também são apropriadas para cultura de anaeróbios.
- Cultura de dispositivo intra-uterino (DIU) tem valor estratégico para cultivo anaeróbio de *Actinomyces* sp.

2.16.3 Secreção uretral

O sucesso da cultura depende da rapidez na entrega da amostra.

N. gonorrhoeae é uma bactéria muito sensível e pode morrer rapidamente se não for semeada imediatamente após a coleta.

- Desprezar as primeiras gotas da secreção.
- Coletar a secreção purulenta, de preferência pela manhã, antes da primeira micção ou há pelo menos duas horas ou mais, sem ter urinado.
- Coletar com alça bacteriológica descartável ou *swab* estéril fino.
- Colocar a amostra em meio de transporte (Stuart) e realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.
- Encaminhar imediatamente ao laboratório.

- Em pacientes assintomáticos, deve-se coletar a amostra através de massagem prostática ou com pequeno *swab* inserido alguns centímetros na uretra.

2.17 Instruções para secreção anal

Inserir o *swab* cerca de 1 cm do canal anal e fazer movimentos circulares para coletar material das criptas anais.

Colocar a amostra em meio de transporte (Stuart) e enviar o *swab* imediatamente ao laboratório.

Amostra recomendada para os diferentes micro-organismos pesquisados de materiais do trato genital masculino e feminino

Cultura	Amostra recomendada
Bactéria	Fluido prostático, cervical, vaginal
Fungo	Anal, vaginal ou cervical
Anaeróbio	Aspirado do epidídimo, fluido amniótico, fluido de abscesso
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vaginal, fluido prostático
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cervical, uretral, anal
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Raspado uretral ou cervical
<i>Treponema pallidum</i>	Lesão genital Obs.: lesões secundárias de sífilis são mais comumente encontradas em membranas mucosas e pele (incluindo palmas da mão e solas do pé); mas qualquer parte do corpo pode ser afetada.
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Úlcera da área perianal e genitália e nódulo inguinal
<i>Mycoplasma hominis</i>	Canal endocervical e uretra

2.18 Instruções para coleta de fezes

Devem ser coletadas no início ou fase aguda da doença, quando os patógenos estão usualmente presentes em maior número e, preferencialmente, antes da antibioticoterapia.

- Coletar as fezes e colocar em um frasco contendo o meio para transporte (Cary Blair ou salina glicerinada tamponada), fornecido pelo laboratório, em quantidade equivalente a uma colher de sobremesa. Preferir sempre as porções mucosas e sanguinolentas.
- Fechar bem o frasco e agitar o material.
- Se a amostra não for entregue no laboratório em uma hora, conservar em geladeira a 4°C, no máximo por um período de 12 horas. Marcar o horário da coleta.

2.18.4 *Swab* retal

- Usar *swab* de algodão, certificando-se de que a ponta da haste que suporta o algodão está bem revestida.
- Umedecer o *swab* em salina estéril (não usar gel lubrificante) e inserir no esfíncter retal, fazendo movimentos rotatórios.
- Ao retirar, certifique-se que existe coloração fecal no algodão. O número de *swabs* depende das investigações solicitadas.
- Para cultura de *S. agalactiae* pode-se utilizar o mesmo *swab* vaginal para coleta de *swab* anal e colocá-lo em caldo Todd-Hewitt. Identificar a amostra e enviar ao laboratório no intervalo de 30 minutos ou utilizar o meio de transporte fornecido.

2.19 Instruções para coleta de urina

A coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de duas a três horas. Pacientes com urgência urinária podem ser dispensados dessa retenção, anotando-se o fato na requisição.

2.19.1 Coleta de urina de mulheres

- Para se obter melhores resultados, a coleta de amostras das mulheres deve ser **supervisionada e realizada** por profissionais treinados.
- **No caso de objeção por parte da paciente**, orientar clara e objetivamente todos os passos do procedimento e alertar quanto às consequências de uma má coleta (necessidade de retornar para nova amostra, dificuldade do médico interpretar, etc.)

Material a ser usado:

- Gaze embebida em sabão.
- Gaze umedecida em água estéril.
- Gaze seca.
- Tampão de gaze (no caso de corrimento ou menstruação).
- Frasco estéril para coleta de urina.
- Sabão neutro.

Os procedimentos podem variar conforme as condições locais da sala de coleta:

- Coleta em vaso sanitário com ducha – realizada pela paciente e supervisionada.
- Coleta em maca – realizada pelo pessoal do laboratório.
- Não aceitar urina colhida em casa, pelas condições de coleta e transporte.

A orientação a seguir refere-se a coleta em maca e serve de exemplo para os principais procedimentos:

Pedir para a paciente:

- Remover toda a roupa da cintura para baixo.
- Deitar na maca, devendo a paciente ser coberta com lençol ou avental próprio.
- Separar as pernas tanto quanto for possível.

Procedimentos do profissional que realiza a coleta:

- Afastar os grandes lábios com uma das mãos e continuar assim enquanto fizer a higiene e coleta do material.
- No caso de menstruação ou na presença de corrimento, remover a secreção visível com gaze e colocar um tampão de gaze durante a coleta.
- Usar uma gaze embebida em sabão, lavar de frente para trás e certificar-se que está limpando por entre as dobras, o melhor possível. Iniciar pela região peri-uretral, introito vaginal, seguindo pelos pequenos e grandes lábios e concluindo pela região perineal (não alcançando a região anal).
- **Enxaguar** com uma gaze umedecida, sempre no sentido de cima para baixo, para limpeza e remoção do sabão. Repetir mais duas vezes esse procedimento.
- **Secar** com outra gaze.
- Continuar afastando os grandes lábios e pedir para a paciente urinar. O início do jato urinário deve ser desprezado na cuba ou comadre. Sem interromper a micção, **colher o jato médio** urinário no frasco estéril (até a metade do frasco).
- Desprezar o jato final na cuba ou comadre.
- Após o término, fechar bem o frasco. Remover o tampão (se usado).
- Levar o frasco para o laboratório (**ou colocar no isopor com gelo**).

2.19.2 Coleta de urina para crianças que não têm controle da micção

- No caso das crianças, fazer uso de saco coletor, masculino ou feminino. Deve-se fazer higienização prévia do períneo, coxas e nádegas com água e sabão neutro. Caso não haja micção, o saco coletor deve ser trocado a cada 30 minutos, **repetindo-se a higienização da área perineal e genital**.

2.19.3 Coleta de urina para homens

- Fazer a higienização cuidadosa da genitália externa, com água e sabão e enxugar. Colher o jato médio, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então com uma retenção urinária de 2 a 3 horas.

2.19.4 Pacientes cateterizados com sistema de drenagem fechada

- Pode-se colher a urina puncionando-se o cateter na proximidade da junção com o tubo de drenagem. Não se deve colher a urina da bolsa coletor-

ra. Clampear o cateter. Fazer antissepsia com álcool 70% do local, colher com agulha e seringa 5 a 10 mL de urina.

2.19.5 Amostras de urina colhidas da extremidade do cateter de Foley

- São impróprias para cultura porque as pontas do cateter estão invariavelmente contaminadas com micro-organismos uretrais. Não devem ser realizadas.

2.19.6 Coleta de urina para cultura de micobactérias

- Solicitar a primeira urina da manhã, após higiene prévia, colhendo toda a micção no frasco fornecido.
- Fazer a coleta durante três dias consecutivos, enviando as amostras diariamente ao laboratório.
- Toda solicitação de BAAR em urina deve ser acompanhada de cultura pois somente a pesquisa direta muitas vezes fornece resultados falso negativos.

2.19.7 Transporte de urina

- O transporte do material deve ser feito o mais breve possível, ou então refrigerar a amostra em caixa de isopor.
- Em geral não há alteração significativa na contagem de colônias se for necessário conservar a urina em geladeira por 24 horas.
- Enviar o material em frascos bem fechados, sem respingos no lado externo do frasco.
- Rotular o frasco e verificar se a requisição médica está devidamente preenchida.

2.20 Instruções para cultura de anaeróbios em materiais diversos

- Anaeróbios podem estar envolvidos em infecções nas mais diversas partes do organismo humano.
- A coleta deve ser feita evitando-se contaminação com a flora normal endógena.
- Na solicitação médica deve constar também cultura para germes aeróbios.
- A boa comunicação entre o corpo clínico e o laboratório com o fornecimento de informações como impressão clínica, estado do paciente ou suspeita de organismo incomum assegura o sucesso da cultura anaeróbia.
- Sempre que possível, mediante uma solicitação de cultura para anaeróbios, a amostra deve ser coletada através de aspirado com agulha e seringa ou através de fragmentos do tecido infectado.
- A coleta com *swab* é a **menos recomendada** pelas seguintes razões:
 - Material pode ser facilmente contaminado com organismos presentes na pele ou na superfície mucosa.

- Os anaeróbios ficarão expostos ao oxigênio ambiente.
- Material está sujeito à secagem excessiva.
- A quantidade de material encaminhada é relativamente pequena.
- São menos satisfatórios que os aspirados para preparação de esfregaços utilizados na análise microscópica, assim como para exame direto macroscópico (impossibilitando a observação de grânulos de enxofre – típico em actinomicose).
- O uso de *swab* com meio de transporte específico deverá ser utilizado como última opção.

2.20.1 Avaliação das amostras para cultura de anaeróbios

Sítio	Amostra Aceitável	Amostra Inaceitável
<ul style="list-style-type: none"> • Cabeça e pescoço 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirado do abscesso coletado com agulha e seringa após descontaminação da superfície • Material de biópsia coletado por cirurgia • <i>Swab</i> obtido por cirurgia quando for impraticável a aspiração • Material superficial coletado com <i>swab</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Swab</i> de orofaringe e nasofaringe • <i>Swab</i> gengival
<ul style="list-style-type: none"> • Pulmão 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirado transtraqueal • Material obtido de punção pulmonar percutânea • Material de biópsia obtido cirurgicamente • Amostra broncoscópica obtida com cateter “double-lumen” 	<ul style="list-style-type: none"> • Escarro expectorado • Escarro induzido • Aspirado endotraqueal • Material broncoscópico não coletado adequadamente
<ul style="list-style-type: none"> • SNC 	<ul style="list-style-type: none"> • Líquor • Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa • Material de biópsia obtido por cirurgia 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Swab</i> aeróbio
<ul style="list-style-type: none"> • Abdômen 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluido peritoneal obtido com agulha e seringa • Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa • Bile • Material de biópsia obtido por cirurgia 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Swab</i> aeróbio
<ul style="list-style-type: none"> • Trato urinário 	<ul style="list-style-type: none"> • Urina coletada por punção suprapúbica 	

Sítio	Amostra Aceitável	Amostra Inaceitável
<ul style="list-style-type: none"> • Trato genital feminino 	<ul style="list-style-type: none"> • Material de laparoscopia • Aspirado endometrial obtido por sucção ou curetagem após descontaminação • Material de biópsia obtido por cirurgia • DIU (Dispositivo intrauterino), somente para <i>Actinomyces</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> • Swab vaginal ou cervical
<ul style="list-style-type: none"> • Ossos e articulações 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirado obtido com agulha e seringa • Material de biópsia obtido por cirurgia 	<ul style="list-style-type: none"> • Material de superfície coletado com Swab
<ul style="list-style-type: none"> • Tecidos moles 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirado obtido com agulha e seringa • Material de biópsia obtido por cirurgia • Aspirado do trato sinusal obtido com cateter plástico • Aspirado profundo de ferida aberta obtido após descontaminação da pele 	<ul style="list-style-type: none"> • Material de superfície coletado da pele ou bordos da ferida • Material coletado com Swab
<ul style="list-style-type: none"> • Estômago e intestino delgado 	<ul style="list-style-type: none"> • Somente na Síndrome de Alça Cega ou Síndrome de Má Absorção 	
<ul style="list-style-type: none"> • Intestino grosso 	<ul style="list-style-type: none"> • Somente para cultura ou pesquisa de toxinas quando houver suspeita de <i>C. difficile</i> ou <i>C. botulinum</i> 	

2.20.2 Tempo de transporte x volume de amostra e/ou método coletado

- Amostra Tempo ótimo para transporte ao laboratório

Amostra	Tempo ótimo para transporte ao laboratório
Aspirados:	
- inferior a 1ml	- 15 – minutos – temperatura ambiente
- superior a 1m	- 30 minutos – temperatura ambiente
Meio de transporte anaeróbio	- 2 horas – temperatura ambiente
Tecido ou material de biópsia	
- recipiente estéril	- 30 minutos – temperatura ambiente
- meio de transporte ou bolsa anaeróbia	- 2 horas – temperatura ambiente
Swabs anaeróbios	
- em tubo com atmosfera anaeróbia	- 1 hora – temperatura ambiente
- em meio de transporte anaeróbio	- 2 horas – temperatura ambiente

Capítulo 3: Microscopia e Coloração

*Emerson Dangui Cavassin
Ângela Von Nowakowsky
Carlos Emílio Levy*

3.1 Direto sem coloração

3.1.1 Salina

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none">• Salina (soro fisiológico – 0,85% de cloreto de sódio)• Lâmina• Lamínula	<ul style="list-style-type: none">• Permite observar a morfologia bacteriana e avaliar a existência de motilidade.• Usada para pesquisa a fresco de Trichomonas em secreções, fungos (leveduriformes ou filamentosos) e em diferentes materiais, etc.	<ul style="list-style-type: none">• Gotejar a salina (uma gota) no centro de uma lâmina de microscopia e nela suspender uma colônia ou uma alçada do material a ser investigado.• Cobrir com uma lamínula e examinar ao microscópio, com objetiva de 40X ou 100X (óleo de imersão).

3.1.2 Hidróxido de potássio

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none">• Hidróxido de Potássio em solução aquosa a 10% ou 20%• Lâmina• Lamínula	<ul style="list-style-type: none">• Usado para pesquisa de fungos (leveduriformes e particularmente filamentosos) em material biológico na presença de muco, restos celulares, pelos, unhas, etc.• Facilita a microscopia por dissolver a queratina e o muco, destacando as estruturas fúngicas, quando presentes.	<ul style="list-style-type: none">• Colocar uma pequena amostra do material a ser pesquisado no centro da lâmina.• Suspender o material com uma a duas gotas de KOH.• Cobrir com lamínula e aguardar 30 minutos.• Aquecer ligeiramente a lâmina para acelerar o clareamento.• Examinar com objetiva de 10X ou 40X, fechando o diafragma.• As lâminas poderão ser colocadas em câmara úmida e, após 24 horas, realizar uma segunda leitura microscópica.

3.1.3 Exame em campo escuro

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none"> • Microscópio com condensador de campo escuro e, quando possível, objetiva de 100X com íris. • Lâmina. • Lamínula. • Salina. • Óleo de imersão. 	<ul style="list-style-type: none"> • Para observar a motilidade de bactérias dificilmente observadas em microscopia direta com salina, como é o caso do <i>Treponema pallidum</i> e da <i>Leptospira</i> sp. • Pode ser usada também para observar a motilidade do <i>Campylobacter</i> sp. e outras bactérias. 	<p>Para o <i>Treponema pallidum</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atritar as bordas da lesão suspeita com um swab ou alça bacteriológica • Colher o exsudato com a própria alça ou fazer um imprint com a lâmina. • Cobrir com a lamínula (utilizar uma gota de salina). • Realizar a pesquisa rapidamente. <p>Para o <i>Leptospira</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utilizar a urina recém-emitida, centrifugada e examinado o sedimento. • Em campo escuro, colocar óleo de imersão entre o condensador e a parte inferior da lâmina (encostar o condensador na lâmina). • Observar com objetiva de 40X para obter o foco. • Avaliar as condições do material, fazendo-se, a seguir, a bacterioscopia por imersão, com objetiva de 100X.

3.1.4 Tinta da China

Material	Indicação	Técnica
<ul style="list-style-type: none"> • Tinta da China (nanquim). • Lâmina. • Lamínula. 	<ul style="list-style-type: none"> • Principalmente para pesquisa de criptococos em líquido ou outros materiais, permitindo destacar a cápsula desse fungo contra um fundo negro. 	<ul style="list-style-type: none"> • Suspender o sedimento do líquido ou uma colônia do meio de cultura em uma gota de tinta da China, fazendo-se um filme bem delgado entre a lâmina e a lamínula. • Observar com objetivas de 10X e 40X. • Caso esteja muito espesso, adicionar uma pequena gota de salina esterilizada na suspensão para facilitar a observação. • Erro comum: confundir linfócitos com criptococos. A diferenciação é feita através da observação do núcleo refringente e gemulação do fungo.

3.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram é utilizada para classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular e comportamento diante dos corantes. No laboratório de microbiologia clínica é um teste adicional rápido para o diagnóstico de agentes infecciosos, sendo também utilizado para avaliar a qualidade da amostra clínica analisada.

As interpretações dos esfregaços corados pelo Gram envolvem considerações relacionadas com as características da coloração, tamanho, forma e agrupamento das células. Essas características podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo idade da cultura, o meio de cultivo utilizado, a atmosfera de incubação e a presença de substâncias inibidoras.

Não se pode deixar de destacar que a coloração de Gram somente será um recurso rápido e útil quando for corretamente realizada (do ponto de vista técnico) e interpretada por profissionais experientes.

■ Utilização

- Para bacterioscopia da maioria dos materiais biológicos ou culturas de micro-organismos em meios sólidos ou líquidos.
- As amostras de culturas jovens (< 24h) de meio de cultura sem inibidores e amostras clínicas recém-coletadas são as que fornecem melhores resultados.
- Na verificação da morfologia bacteriana a partir de esfregaços de cultura em caldo.

3.2.1 Equipamentos e materiais necessários^c

• Lâminas de vidro limpas e desengorduradas 7,5 cm x 2,5 cm	• Centrífuga e/ou citocentrífuga
• Tubos estéreis	• Lata para descartar o material contaminado
• Alça bacteriológica	• Incinerador ou bico de Bunsen
• Meio de cultura	• Óleo de imersão
• Pipeta e ponteiras estéreis	• Agitador tipo Vortex
• Luvas (quando necessário)	• Lâminas de bisturi
• Cronômetro	• Chapa com aquecimento brando para fixação dos esfregaços (50°C)
• Salina estéril 0,85%	• Microscópio
	• Metanol ou etanol absoluto para fixação

^c Observação: materiais clínicos coletados com *swab* são menos recomendados para cultura. Coletar, sempre que possível, dois *swabs*: um será utilizado para fazer o esfregaço e o outro para cultura.

3.2.2 Esfregaços

Os esfregaços devem ser preparados com um gradiente de espessura suficientemente denso para facilitar a visualização, mas, também, bastante esparsos para revelar as características dos agrupamentos.

Utilizar, de preferência, lâminas limpas e novas (não oxidadas). Os melhores resultados serão obtidos se as mesmas permanecerem no álcool até o momento do uso.

Técnica para preparo do esfregaço:

- Identificar a lâmina de maneira segura, usando lâminas com extremidade fosca.
- Rolar toda a superfície do *swab* sobre o centro da lâmina procurando fazer um esfregaço fino e uniforme e não destruindo as células.
- Fixar rapidamente na chama.
- Quando material é escasso, demarcar a área do esfregaço.
- Proceder o método de coloração mais apropriado.

3.2.3 Material Clínico

<ul style="list-style-type: none"> • Amostra coletada com <i>swab</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rodar o <i>swab</i> suavemente pela lâmina limpa, evitando a destruição dos elementos celulares e dos grupamentos. • Quando somente um <i>swab</i> for coletado, colocá-lo em um tubo estéril contendo uma pequena quantidade de salina estéril (0,4 mL) e agitar (vortex). • Comprimir o <i>swab</i> contra as paredes do tubo e utilizá-lo para fazer o esfregaço. O restante do material pode ser inoculado nos meios de cultura.
<ul style="list-style-type: none"> • Aspirados, exsudatos, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Materiais recebidos em seringas serão transferidos para um tubo estéril. • Selecionar a porção mais purulenta ou mucosa com pipeta ou alça bacteriológica. • Amostras muito espessas ou purulentas podem ser diluídas com uma gota de salina estéril e espalhadas sobre uma grande área da lâmina formando um esfregaço delgado.
<ul style="list-style-type: none"> • Escarro 	<ul style="list-style-type: none"> • Com auxílio de alça bacteriológica ou um palito de madeira, “pescar” uma porção purulenta do escarro que seja representativa. • Rolar essa porção na parede do frasco para separar do material salivar. • Em seguida, colocar o material na extremidade de uma lâmina limpa confeccionando um esfregaço delgado. • Quando a quantidade de saliva for grande e pequenas porções purulentas forem visíveis, transferir a amostra para uma placa de Petri para facilitar a retirada do material representativo.

<ul style="list-style-type: none"> • Líquor ou outros fluidos orgânicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Muitos laboratórios utilizam a citocentrífuga (<i>cytopsin</i>) para concentrar os líquidos orgânicos e fazer os esfregaços. Esse método tem sido utilizado para aumentar a sensibilidade da coloração de Gram, diminuir o tempo de centrifugação e agilizar o resultado. Materiais aparentemente límpidos devem ser previamente centrifugados a 2.000-5.000 rpm /15 minutos e o esfregaço feito a partir do sedimento. • Após a centrifugação, remover o sobrenadante com uma pipeta estéril, deixando, aproximadamente, 0,5 mL de sedimento • Colocar uma gota do sedimento numa lâmina limpa, sem espalhar e deixar secar. • Para aumentar a concentração do fluido a ser examinado, adicionar uma segunda gota na mesma área da lâmina, anteriormente utilizada.
<ul style="list-style-type: none"> • Urina jato médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Homogeneizar bem o material e utilizar uma gota da amostra, sem centrifugação, deixando secar próximo a um bico de Bunsen aceso.
<ul style="list-style-type: none"> • Biópsias ou fragmentos de tecido 	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar o material em uma placa de Petri estéril. • Triturar com auxílio de um bisturi ou usando um gral e pistilo estéreis. • Preparar os esfregaços fazendo vários <i>imprints</i> numa lâmina limpa, de preferência, estéril.

Cultura em caldo

- Transferir uma gota para uma lâmina limpa utilizando alça bacteriológica ou pipeta.
- Espalhar suavemente o material a fim de obter um esfregaço delgado.

Meio sólido

- Utilizar uma gota de salina estéril em uma lâmina limpa.
- Transferir uma pequena porção da colônia com alça bacteriológica.
- Misturar suavemente para obter um esfregaço levemente turvo e homogêneo.

Observação: para evitar a formação de aerossóis, nunca misturar o material vigorosamente.

Fixação do Esfregaço

- Calor
 - Todo o esfregaço, antes de ser submetido à coloração, deverá estar seco (exposto ao ar), sendo fixado com calor brando (50°C). A fixação excessiva e o superaquecimento irão distorcer a morfologia celular e a fixação insuficiente permitirá a saída do material durante o processo de coloração. Deixar a lâmina esfriar antes de iniciar a coloração.
- Metanol ou Etanol
 - A fixação pelo metanol ou etanol também pode ser utilizada. Além de prevenir a lise das hemácias, evita que os esfregaços, principalmente os

de urina, desprendam-se no momento da coloração. Deixar o esfregaço secar numa superfície plana; após, colocar uma a duas gotas de álcool (1 minuto), drenando o excesso, sem lavar. Não aquecer a lâmina antes da coloração.

3.2.4 Preparo do reagente para a coloração de Gram (modificado por Hucker)

Cristal-violeta – solução estoque:

- Solução A –
 - Cristal-violeta 40 g
 - Álcool etílico a 95% 400 mL
- Solução B –
 - Oxalato de amônio 16 g
 - Água destilada 1600 mL

Validade das soluções A e B: 1 ano em temperatura ambiente.

Cristal-violeta – solução de uso:

- Solução A 40 mL
- Solução B 160 mL
- Misturar as duas soluções.
- Deixar em repouso e filtrar após 24 horas.

Lugol (mordente):

- Iodo metálico 1 g
- Iodeto de potássio 2 g
- Água destilada 300 mL

Validade: seis meses em temperatura ambiente.

- Misturar o iodo e o iodeto de potássio em um gral, até que estejam bem homogeneizados.
- Acrescentar água lentamente para dissolução completa. Guardar em frasco de âmbar.

Precauções: a solução de iodo/iodeto de potássio é corrosiva. Evitar inalação, ingestão ou contato com a pele.

Descolorantes:

- Álcool etílico a 95% – agente descolorante lento.
- Álcool etílico a 95% e acetona (**1:1**) – agente descolorante intermediário.

- Exige maior habilidade por parte do operador para que não ocorra hiperdescoloração.
- Validade: um ano armazenado em frasco de âmbar a temperatura ambiente.

Precauções: etanol e acetona são inflamáveis.

Contra-corante:

- Solução de reserva -
 - safranina 5 g
 - álcool etílico a 95% 500 mL
- Solução de trabalho -
 - solução de reserva 10 mL
 - água reagente 90 mL

Validade: um ano em temperatura ambiente ou fucsina básica a 0,1% ou 0,2% em água reagente; e seis meses em temperatura ambiente em frasco de âmbar.

- Misturar suavemente até a dissolução.

3.2.5 Coloração

- Cobrir a área com a solução de cristal-violeta por cerca de um minuto.
- Decantar o cristal-violeta e lavar suavemente com a própria solução de iodo ou água da torneira. (Obs.: lavagem excessiva nessa etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas).
- Cobrir a área do esfregaço com a solução de iodo durante cerca de um minuto.
- Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona (1:1), até que o solvente escorra incolor.
- Alternar com água corrente (jato fraco). O tempo usualmente utilizado nessa etapa é de cerca de 10 segundos. (Obs.: lavagem excessiva nessa etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas, assim como, a pouca descoloração pode resultar em pouca retirada do cristal violeta, ocasionando uma tonalidade azulada nas bactérias Gram-negativas).
- Cobrir o esfregaço com a solução de safranina (ou Fucsina básica 0.1% a 0.2%), por cerca de 30 segundos.
- Lavar com água corrente.
- Deixar secar ao ar, ou em temperatura branda (50°C) usando secador de cabelos.

3.2.6 Como reportar os resultados

As bactérias Gram-positivas retêm o cristal-violeta e se apresentam com coloração violeta enquanto as Gram-negativas são descoradas pelo álcool-acetona, sendo, portanto, coradas com o corante de fundo (fucsina ou safranina) e se apresentam avermelhadas.

3.2.7 Leitura do Gram

- Utilizando a objetiva de menor aumento (10X), fazer uma análise do esfregaço como um todo, avaliando:
 - a qualidade e uniformidade da coloração e a espessura do esfregaço;
 - se o material clínico coletado é apropriado para cultura, observando a quantidade relativa de leucócitos, hemácias, células epiteliais;
 - a presença de bactérias pertencentes a microbiota normal, indicando uma coleta inadequada da amostra clínica;
 - presença, localização e tipo de agrupamento bacteriano;
 - presença de filamentos, pseudo-hifas e leveduras.

Passar para a objetiva de imersão (100X) e examinar várias áreas para melhor avaliação da coloração e dos diferentes tipos de micro-organismos presentes, principalmente perto de células inflamatórias.

Sistema de Quantificação

- Relatar células epiteliais, leucócitos e micro-organismos de forma numérica ou qualitativa observando o esfregaço em imersão 1000x(10 ocular e objetiva 100):
 - Numérica:
 - 1+ – < 1 por campo de imersão
 - 2+ – 1 por campo de imersão
 - 3+ – 2-10 por campo de imersão
 - 4+ – predomínio ou >10 por campo de imersão
 - Qualitativa
 - Raros – <1 por campo de imersão
 - Poucos – 1 a 5 por campo de imersão
 - Moderados – 5 a 10 por campo de imersão
 - Abundantes – > de 10 por campo de imersão

3.2.8 Causas comuns de erro

- Precipitação do corante violeta simula cocos Gram-positivos.
- Uso de lâminas que não tenham sido pré-limpas ou desengorduradas.
- Espessura do esfregaço, que pode corar irregularmente.

- Superaquecimento na fixação pelo calor, levando à destruição da morfologia.
- A descoloração insuficiente com álcool-acetona permite a retenção do cristal-violeta, o que dificulta a observação de bactérias Gram-negativas. Por outro lado, esfregaços obtidos de culturas velhas ou contendo numerosas bactérias mortas ou expostas à ação de antibióticos apresentam irregularidades na coloração. As bactérias Gram-positivas perdem a capacidade de reter o cristal-violeta, apresentando-se Gram-negativas; as Gram-negativas podem se corar mais fracamente pela safranina, podendo simular a ocorrência de infecções mistas (Gram positivas/Gram-negativas).
- A discordância de resultado entre o esfregaço corado pelo Gram e a cultura pode estar relacionada com a coleta ou meios de transportes e conservantes inadequados.
- Um resultado positivo de Gram com cultura negativa pode sugerir contaminação do corante, presença de agentes antimicrobianos na amostra do paciente ou falha no crescimento de micro-organismos devido às condições utilizadas (atmosfera, ação seletiva dos meios de cultura, etc.).

3.2.9 Controle de qualidade

- Verificar diariamente a aparência dos reagentes. Se a solução de cristal-violeta precipitar, refiltre antes de usar. A evaporação pode afetar a eficácia dos reagentes. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam trocadas regularmente, dependendo da demanda.
- Diariamente e quando novos reagentes forem preparados, corar, juntamente com os esfregaços da rotina, lâminas controles. Esfregaços de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) são preparados e fixados.
- Resultados esperados:
 - bacilos Gram-negativos, coloração rósea;
 - cocos Gram-positivos, coloração violeta.

Sistema de revisão dos resultados do Gram:

- A revisão diária de lâminas de Gram, selecionadas pelo supervisor, pode ajudar a determinar a necessidade de treinamento e adicionar informações de relevância clínica.
- Comparar resultados da cultura com a leitura do Gram.
- Fazer manutenção preventiva e limpeza dos microscópios.

3.3 Outras colorações

3.3.1 Albert Laybourn (Corinebactérias)

Solução A

- Azul-de-toluidina 0,15g
- Verde-malaquita 0,20g
- Ácido acético glacial 1ml
- Álcool 95% 2ml
- Água destilada 100ml

Solução B

- Iodo 2g
- Iodeto de potássio 3g
- Água destilada 300ml

Execução

- Corar três minutos com solução A.
- Escorrer e, lavar com água corrente, cobrir com solução B.
- Após dois minutos, lavar com água corrente rapidamente.
- Enxugar com papel filtro e secar sem passar na chama.
- Observar o corpo bacteriano corado em verde e os grânulos metacromáticos (castanho-escuro).

3.3.2 Coloração de Ziehl-Neelsen

Solução de carbolfucsina

- Fucsina básica 0,3 g
- Álcool etílico a 95% 10 mL
- Cristais de fenol derretidos ... 5 mL
- Água destilada 95 mL
- Dissolver a fucsina básica no álcool e o fenol na água. Misturar as duas soluções.
- Deixar repousar por vários dias antes de usar.

Ácido-álcool

- Álcool etílico 97 mL
- Ácido clorídrico concentrado 3 mL

Coloração de fundo (azul-de-metileno)

- Azul-de-metileno 0,3 mL
- Água destilada 100 mL

Execução

- Cobrir a superfície da lâmina com a solução de carbolfucsina.
- Aquecer a lâmina coberta com o corante, lentamente com auxílio de um bico de Bunsen, até a emissão de vapores, tomando o cuidado para não deixar ferver.
- Aquecer com calor baixo ou intermitente por um período de três a cinco minutos.
- Deixar a lâmina esfriar.
- Lavar a lâmina com água corrente.
- Cobrir a lâmina com solução de álcool – ácido a 3% e descorar o esfregaço até que o corante não drene mais da lâmina.
- Lavar a lâmina com água corrente e esgotando todo resíduo da mesma.
- Cobrir a lâmina com o corante de contraste (azul de metileno), por 20 a 30 segundos.
- Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar naturalmente sem forçar com papel de filtro.
- Examinar o esfregaço com objetiva de imersão no aumento de 100x.



Capítulo 4:
Semeadura em Meios de Cultura

Emerson Dangui Cavassin
Ângela Von Nowakonsky
Elsa Masae Mamizuka

4.1 Material clínico e os respectivos meios de cultura

4.1.1 Meios de cultura para semeadura dos principais materiais clínicos e indicação de exames microscópicos, que podem ser alterados conforme suspeita clínica

Material	Meios de Cultura ¹								
	AC	AS	MC	TIO	Outro	LJ	SAB	MYC	Lâmina
Abscesso profundo		X	X	X					uma
Ferida cutânea/cirúrgica		X	X			X	X	X	uma
Abscesso cerebral	X	X	X	X		X	X	X	duas
Abscesso pulmonar	X	X	X	X					duas
Biópsia	X	X		X					duas
Coprocultura (fezes)			X		SS				não
Líquido de Diálise	X	X	X						uma
Endométrio/ Amniótico	X	X		X					uma
Escarro piogênico		X	X						duas
Escarro para Tuberculose						X			uma
Esperma/ Prostático		X	X						uma
Fístula/ Dreno		X	X						não
Gânglio	X	X		X		X	X	X	duas
Lavado Brônquico (BAL)	X		X			X	X	X	uma
Líquor (LCR)	X	X				X	X	X	duas
Nasal/ Orofaringe		X	X						não
Osso (Biópsia / Aspirado)		X	X	X					uma
Ocular	X	X	X						duas
Orofaringe		X	X						uma
Ouvido	X	X	X						uma
Peritonal/Ascítico	X	X	X	X					uma
Pleural	X		X	X		X			duas
Ponta de cateter		X							não
Sangue/Hemocultura	X	X							uma
Uretral	X	X			TM				uma
Urina					CLED				uma
Vaginal/Endocervical	X	X	X		TM				uma

* Rodapé da tabela (bacterioscopia: quando solicitado pode ser interessante para observar se há desvios de flora e presença de leucócitos)

1 AC = ágar chocolate; AS = ágar sangue; MC = ágar Mac Conkey; TIO = caldo tioglicolato; LJ = ágar Lowenstein Jensen; SAB = ágar Sabouraud; MYC = Mycosel; SS = ágar Salmonella-Shigella; TM = ágar Thayer Martin (opcional); CLED = ágar CLED

4.1.2 Cultura para fungos ou micobactérias

- Para fungos: Sabouraud e Mycosel, ver orientação específica para semeadura.

- Para micobactérias: Lowenstein Jensen, materiais contaminados com flora devem ser previamente descontaminados (escarro, urina, aspirado gástrico, lavado bronquio-alveolar, fezes).

4.1.3 Coprocultura

- Recomendado semear em caldo enriquecedor do tipo Selenito, Tetratio-nato, etc. apenas para pesquisa de portadores.

4.1.4 Escarro para tuberculose

- Deve ser conservado em geladeira ou tratado para descontaminação, antes de semear em Lowenstein Jensen (*vide* módulo de micobactérias).

4.1.5 Lavado brônquico

- Homogeneizar o material em vortex.
- Centrifugar parte do material e fazer duas lâminas com o sedimento.
- Se houver pedido de pesquisa de micobactérias e fungos, fazer quatro lâminas.
- Semear 10 µL com alça descartável ou calibrada e semear em Ágar Chocolate para contagem de colônias (1/100).
- Diluir 1 mL da amostra em 9,0 mL de salina estéril, homogeneizar e semear 10 µL em Ágar.
- Chocolate para contagem de colônias (1/1.000).
- Semear dessa mesma diluição com a alça de 1 µL em Ágar Mac Conkey para contagem de colônias (1/10.000).

4.1.6 Líquido Céfalorraquidiano (LCR)

- Centrifugar por 10 minutos/ 2.000 rpm (rotações por minuto); quando purulento, semear sem centrifugar.
- Semear em Ágar Chocolate + Ágar Sangue. O uso de Caldo Tioglicolato é questionável, pois não aumenta a sensibilidade, mas sim o risco de isolamento de contaminantes, mas pode ser útil para manter o agente viável (exceto fastidiosos) para outros procedimentos.
- Quando solicitado, pesquisar *Cryptococcus*, usando coloração com tinta da China.

4.1.7 Ponta de cateter

- Cinco cm da ponta do cateter deve ser rolada 5 vezes sobre a placa de Ágar Sangue, utilizando a técnica semiquantitativa de Maki, útil para evidenciar colonização extraluminal do cateter e indicado quando o cateter foi removido por suspeita de colonização e houver hemocultura positiva. Quando for necessária a documentação de colonização intra-luminal e for enviado pedaço maior de cateter pode-se injetar 1 mL de salina ou caldo

BHI ou TSB e colocar no Vortex para aumentar a sensibilidade. O mesmo pode ser feito para cateteres de longa duração com reservatório. Por se tratar de metodologia trabalhosa e resultados nem sempre satisfatórios, o diagnóstico de infecção associada ao cateter costuma ser feito pela coleta de pelo menos duas amostras de hemocultura: uma periférica, e outro de cada via do cateter, uma após a outra e com volumes iguais.

4.1.8 Hemoculturas positivas

- Fazer bacterioscopia (Gram) e semear em Ágar Chocolate, Ágar sangue e Ágar MacConkey. Nunca semear só em MacConkey ao ver bacilos Gram-negativos na bacterioscopia pois poderá não crescer ou poderá perder a oportunidade de detectar infecções mistas.
- Frascos para micobactérias, fazer bacterioscopia (Ziehl).
- Frascos positivos por automação, e que não revelarem o crescimento de bactérias, micobactérias ou fungos, devem ser semeados em anaerobiose e observados por coloração de Giemsa para pesquisa de outros agentes.

4.1.9 Urina

- Dever ser semeada com alça calibrada de 10 µL em Ágar CLED. Pode-se optar por semear em Ágar sangue e ágar MacConkey. Opção de lamino-cultivo deve ser considerada pelo laboratório, bem como o uso de meios cromogênicos, levando em conta o volume de exames, experiência dos profissionais no uso e na interpretação desses meios.
- Para urinas com suspeita de elevada contagem ou infecção mista, pode-se semear com alça de 1 µL.
- Se houver pedido de bacterioscopia: colocar 10 µL da urina sobre uma lâmina nova e deixar secar, corar pelo Gram, e verificar a presença de bactérias em aumento de 1.000x (imersão).
- Para diagnóstico da tuberculose: a primeira urina da manhã deve ser descontaminada antes de semear (*vide* micobactérias).

4.1.10 Secreção vaginal, endocervical, uretral e urina

- Fazer exame a fresco de secreção vaginal para pesquisa de *Trichomonas*.
- Centrifugar a urina para pesquisa de *Trichomonas*.
- Na cultura para *Neisseria gonorrhoeae* é suficiente Ágar-Chocolate; para melhorar o isolamento, semear material endocervical e uretral, utilizando o meio seletivo de Thayer Martin ou outro meio seletivo similar.
- *Mycoplasma* e *Ureaplasma swab* uretral ou endocervical, removendo previamente a secreção e colhendo as células da mucosa por rotação do *swab* no canal; usar meio de transporte específico.

4.1.11 Para amostras sólidas: biópsias, gânglios, amostras de tecidos, etc

- Fragmentar o material com um gral e pistilo de porcelana ou vidro estéreis contendo 1-2 mL de salina estéril.
- Semear os fragmentos ou a porção líquida, e guardar o restante do material na geladeira para eventual uso.
- Estudos quantitativos são mais indicados para avaliação diagnóstica, embora trabalhosos, pois dependem de pesar o material sólido (pesar o frasco com o material e o frasco sem o material; a diferença representa o peso do tecido). A seguir triturar em 5 mL de salina, diluir em volume definido de salina estéril, semear volume definido (10 ou 100mL com pipeta calibrada, usando ponteira estéril). O cálculo para a contagem de colônias deve levar em conta o número de colônias encontradas x diluição dividido pelo número de gramas de tecido usado. Resultado final em número de UFC/grama de tecido.
- Significativas as contagens superiores a 100.000 ufc/gr.

4.1.12 Líquido de diálise

- Recomenda-se fazer cultura quantitativa semeando-se como urina, com alça calibrada e contagem de colônias, usando alça de 10 µL e liberando o resultado em UFC/mL (multiplicando por 100).
- Paralelamente faz-se cultura qualitativa semeando 2 a 3 mL em 5 mL de caldo (TSB, BHI ou Tioglicolato).
- No caso de cultura quantitativa negativa e qualitativa positiva, relatar: cultura positiva para (nome da bactéria isolada), menor que 10² UFC/mL.

4.1.13 Casos especiais

- No caso **de secreção prostática**, em que o material é bastante escasso, e existe contaminação uretral, recomenda-se semear rapidamente após a coleta com alça calibrada de 10 µL, e o resultado deve-se relatar em UFC/mL (multiplicando o número de colônias significativas do mesmo agente por 100), como para uroculturas.
- Para outros materiais escassos colhidos com *swab* em meio de transporte (material de **vesículas, swab de córnea ou conjuntiva, uretral**, etc.), pode-se semear diretamente o *swab* nos meios de cultura indicados, ou tentar obter uma concentração do material do *swab* colocando-o em tubo estéril com 0,5 mL de salina estéril. Em seguida, agitar no vortex (mixer), centrifugar e utilizar o sedimento como inóculo, podendo também utilizá-lo para fazer esfregaço para bacterioscopia.

4.1.14 Escolha de meios de cultura seletivos em relação ao agente

Agente	Meio específico de acordo com manuais de fabricantes
<i>Bordetella pertussis</i>	Ágar sangue Bordet-Gengou
<i>Brucella</i> spp.	Brucella ágar
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campylobacter ágar
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Ágar cistina-telurito
<i>Legionella</i> spp.	Ágar carvão-extrato de levedura tamponado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ágar Listeria McBride
Mycoplasma/ureaplasma	Transporte: Meio B10 Shepard Cultura: Meio A7 Shepard
<i>Neisseria</i>	Thayer Martin
<i>Neisseria meningitidis</i>	Thayer Martin
<i>Vibrio</i> spp.	TCBS
Obs: existem meios cromogênicos específicos para diferentes patógenos	Salmonella spp. e <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> O 157. Para algumas espécies de <i>Candida</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , etc.

4.2 Procedimentos para semeadura em meios de cultura

4.2.1 Semeadura qualitativa

- Organizar as placas, pré-aquecidas em estufa (ideal para fastidiosos), ou à temperatura ambiente, sobre a bancada conforme o material a ser semeado.
- Identificá-las com o número da amostra e iniciais do paciente.
- Separar as lâminas correspondentes a cada exame, a serem preparadas e identificá-las.
- Homogeneizar o material, quando líquido (urina, LCR, sangue, pleural, etc.).
- Escolher a porção mais purulenta no caso de secreções, ou no caso de fezes, a parte com sangue, muco ou pus.
- Os *swabs* deverão ser rolados sobre os meios de cultura, seguindo a sequência dos mais ricos para os mais seletivos (Ágar Chocolate, Ágar Sangue, Mac Conkey).
- Com material muito líquido (LCR, pleural não purulento) concentrar o material por centrifugação a 2.500 rpm (1500 g) por 10-15 minutos e semear o sedimento.
- Na semeadura de rotina pode-se utilizar placas com divisões de dois e três compartimentos para racionalização de gastos, mas seu uso exige maior habilidade na semeadura a fim de se obter colônias isoladas. Ex.: hemocultura em placa tríplice: Ágar sangue, Ágar chocolate e Ágar Mac Conkey.
- Secreções em placa dupla: Ágar sangue e Ágar Mac Conkey, proceder uma semeadura que permita o crescimento de colônias isoladas.

4.2.2 Técnica de Semeadura Qualitativa

- A semeadura para cultivo qualitativo pode ser feita com o próprio *swab* (do meio de transporte), ou amostra do material removida com alça (estéril) flambada e semeada de forma a obter um gradiente decrescente de concentração do inóculo, que permita o isolamento de todas as colônias diferentes.
- Recomenda-se que a semeadura e a leitura das placas sejam realizadas pelo mesmo profissional para aprimorar a técnica de semeadura e isolamento de colônias.

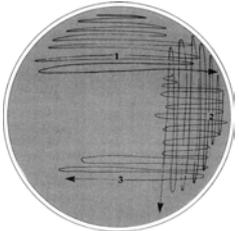
4.2.3 Semeadura quantitativa

Materiais indicados ou recomendados

- Urina
- LBA (lavado bronco alveolar)
- Aspirado traqueal
- Biópsia de tecido
- Hemocultura periférica x cateter para diagnóstico de infecção relacionada ao cateter
- Líquido de diálise
- Secreção prostática
- Cateter (técnica de Maki e outras)

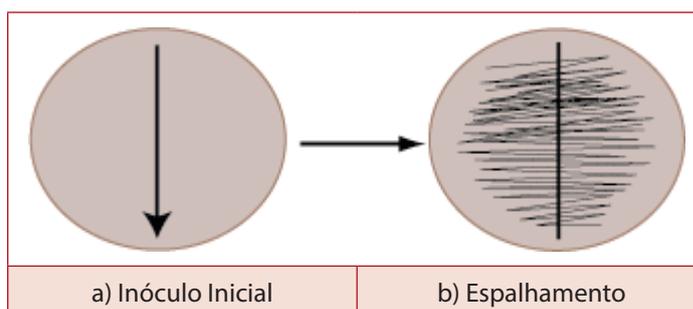
Técnica de Semeadura Quantitativa

- O cultivo quantitativo baseia-se na semeadura de um volume conhecido de material e a contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônia) obtidas após incubação. Utilizam-se dois artifícios para o efeito de diluição do material.
- Uso de pequenos volumes: normalmente de 1, 10 ou 100 μL . O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 mL, relativo ao volume inoculado: 1.000, 100 ou 10, respectivamente. Pode ser realizada utilizando-se volume de material definido pela capacidade da alça calibrada ou volume da pipeta com ponteira estéril.
- Técnicas dilucionais: costuma-se utilizar a diluição seriada do material em escala decimal, isto é, 1:10, 1:100, 1:1.000 ... O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 mL, relativo à diluição utilizada; 10, 100, 1.000 ..., respectivamente.

	<ul style="list-style-type: none"> • Descarregar o material num canto da placa
	<ul style="list-style-type: none"> • Flambar a alça
	<ul style="list-style-type: none"> • Esfriar a alça em um canto do ágar
	<ul style="list-style-type: none"> • Semear partindo da ponta da primeira semeadura
	<ul style="list-style-type: none"> • A cada mudança de direção flambar a alça e esfriá-la

4.2.4 Procedimentos gerais

- Homogeneizar o material com agitação manual em diferentes direções ou em vortex (mixer).
- Obter o volume definido pela técnica com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada. No caso da alça, observar a integridade da película formada até depositá-la na parte superior da placa. Ainda com a alça, sem flambar até o final da semeadura, distribuir o material em linha reta até a outra extremidade. Perpendicularmente, distribuir o material por toda a superfície de maneira uniforme. Repetir o mesmo procedimento por 3 vezes, ou até que a superfície da placa esteja seca, alterando a direção da estria (*vide* figura abaixo).
- Evitar o uso de placas úmidas e, após semeada, não incubar caso haja umidade na superfície do ágar.
- Evitar o rompimento do ágar, estriando o material suavemente.
- Uma suspensão com 10^5 UFC/mL deve resultar em um tapete de colônias que cubra toda a superfície do ágar de maneira uniforme, com colônias confluentes.



4.2.5 Incubação

A incubação deve seguir alguns parâmetros determinados.

Atmosfera

- Para bactérias não exigentes em secreções, urina, fezes, etc. incubar em estufa em atmosfera ambiente.

- Para bactérias exigentes tais como: pneumococos, hemófilos e Neisserias ou fastidiosos incubar em microaerofilia (Jarra com vela acesa de modo a obter 3-5% de CO₂).
- Para *Campylobacter* é necessário tensão de 5 a 10% de CO₂ e restrição de O₂ sendo conveniente o uso de geradores específicos.
- Para bactérias anaeróbias, incubar em sistema de anaerobiose estrita.

Temperatura

- 36°C +/- 1°C é a temperatura para a grande maioria das bactérias da rotina, incluindo os anaeróbios e micobactérias.
- Fungos podem ser cultivados a 30°C ou 25 e 35°C.
- Temperatura a 42°C pode ser necessária para isolar espécies de *Campylobacter*.

Umidade

- Bactérias fastidiosas e exigentes (neisserias patogênicas e hemófilos) crescem melhor se forem incubadas num recipiente com tensão de 5% de CO₂ com um chumaço de algodão embebido em água estéril.

Tempo

- Em geral, a primeira leitura é realizada com 18 a 24 horas de incubação ou em casos de urgência para iniciar a identificação e antibiograma, a partir de 6 horas é possível visualizar crescimento de algumas enterobactérias.
- Para anaeróbios é recomendável a primeira leitura com 48 a 72 horas de incubação.
- Para bactérias exigentes ou de crescimento lento o período de incubação pode ser bastante prolongado: Micobactérias de 3 a 45 dias; *Nocardia*, 4 a 7 dias; *Brucella* 3 a 7 dias (hemoculturas até 45 dias). Para complexo *B. cepacia* 48-72h.

Leitura

- Alguns aspectos são fundamentais na leitura inicial das placas para se estabelecer um diagnóstico presuntivo e direcionar o exame.

4.2.6 Características macroscópicas das colônias

Tamanho

- O tamanho das colônias deverá ser considerado na placa como um todo, uma mesma cepa pode formar colônias de tamanhos variados em diferentes pontos da placa.
- Puntiforme (<1 mm de diâmetro) – colônias muito pequenas, características de bactérias mais exigentes.

- Pequena (até 2 mm de diâmetro) – *Shigella* e *Yersinia* costumam crescer em ágar MaC Conkey e ágar Salmonella-Shigella como colônias pequenas e lactose negativas. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., pneumococos, *Streptococcus* spp. *Cândida* spp. e alguns esfafilococos coagulase negativo também costumam formar colônias pequenas.
- Média (até 3 mm de diâmetro) – Enterobactérias e estafilococos.
- Grandes (mais de 4 mm de diâmetro) – *Bacillus* spp., algumas enterobactérias como *Klebsiella* e *Enterobacter*, ou *Pseudomonas aeruginosa*. Vale lembrar a formação de véu, característico do gênero *Proteus*, *Comamonas* e algumas cepas de *Pseudomonas*.

Cor

A coloração dependerá do meio de cultura utilizado.

Meios não diferenciais – pode-se identificar a coloração característica de alguns micro-organismos:

- *S. aureus* – amarelo
- *Micrococcus* – amarelo
- *Serratia marcescens* ou *rubidae* – avermelhado
- *Roseomonas* – róseo
- *Pseudomonas* – diferentes tons de verde e castanho
- *Enterococcus casseliflavus* – amarelo

Meios diferenciais – a coloração da colônia sofre interferência das reações que ocorrem com substratos dos meios de cultura:

- Utilização da lactose no MacConkey – vermelho
- Utilização da lactose no CLED – amarelo
- Utilização do manitol em Ágar manitol salgado – amarelo
- Produção de H₂S no TSI, Hecktoen Enteric e Salmonella-Shigella – negro

Hemólise

- Baseada na lise de hemácias contidas no Ágar Sangue (5%).
- Lise total – denominada beta-hemólise, ocorre a formação de halo de transparência ao redor e/ou sob a colônia: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Listeria*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus*.
- Lise parcial – denominada alfa-hemólise, há formação de halo com coloração esverdeada: *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus*.
- Ausência de lise – definida como gama-hemólise, meio de cultura inalterado: *Enterococcus*, Estafilococos coagulase negativo.

Forma da colônia

- Redonda – *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, Estafilococos, Estreptococos
- Irregular – *Pseudomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Bacillus*
- Produção de véu – *Proteus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*
- Filamentosas – fungos filamentosos
- Formando pontas, como estrelas – *Candida albicans*
- Com depressão no centro – Pneumococo
- Cerebriforme – *Pseudomonas stutzeri*
- Elevada – *Klebsiella*, *Bacillus*
- Chata – *Enterobacter*, *Pseudomonas*

Consistência

- Friável, quebradiça – *Moraxella*
- Mucóide – *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*
- Seca – *E. coli*, *Citrobacter*
- Butirosa (manteiga) – *Candida*

Cheiro

- Cheiro de cloro: *Eikenella corrodens*
- Perfume ordinário: *Pseudomonas aeruginosa*
- Cheiro fétido: Anaeróbios
- Caramelo – alguns *Streptococcus viridans*
- Fermento – *Candida* spp.
- Queijo – *S. aureus*
- Terra – *Nocardia* e *Streptomyces*
- Peixe – *Acinetobacter* em ágar sangue

Densidade

- Opaca: *E. coli*, *Candida*, *S. aureus*
- Brilhante: *Stenotrophomonas*, Pneumococo
- Translúcida: *Streptococcus beta hemolítico*

4.2.7 Avaliação do crescimento e contagem

Cultura Quantitativa

- Avaliar a homogeneidade de crescimento pela placa.
- Contar separadamente todas as colônias diferentes entre 30 e 300 UFC.
- Para a contagem deve-se marcar com uma caneta o verso de cada unidade contada, para evitar que se conte duas vezes a mesma colônia.
- Contagens maiores devem ser determinadas por estimativa:
 - Dividir a placa em 4 ou 8 partes.

- Observar a homogeneidade do crescimento e contar as partes que sejam mais representativas do crescimento total.
- Contar o número de UFC da parte escolhida e multiplicar pelo total de partes.
- Converter o número de UFC contadas em UFC/mL ou UFC/g, conforme o material analisado.

Utilizar o fator de correção:

- **do volume:**
 - 1 µL – multiplicar por 1000
 - 10µL – multiplicar por 100
 - 100µL – multiplicar por 10
- **e/ou diluição:**
 - diluição 1:10 – multiplicar por 10
 - diluição 1:100 – multiplicar por 100
 - diluição 1:1000 – multiplicar por 1000

Cultura Semiquantitativa e Qualitativa

Para a maioria das culturas não se padroniza o volume do inóculo e semeia-se o *swab* e/ou o material mais representativo com a alça, com a finalidade apenas de obter colônias isoladas para posterior identificação (secreções cutâneo-mucosas, fezes, etc.).

Para esses materiais o objetivo pode ser encontrar um patógeno específico entre bactérias da microbiota considerada normal na área de onde foi obtida a amostra clínica (*S. pyogenes* em orofaringe, *Salmonella* e *Shigella* em fezes, *N. gonorrhoeae* em secreção uretral, etc).

Outras vezes, deve-se relatar as bactérias potencialmente patogênicas e descrever a relação entre as colônias isoladas (predomínio de..., presença de... ou raras colônias de...)

Ex: Cultura de ferida cirúrgica = predomínio de *S. aureus*, presença de *P. aeruginosa* e raras colônias de *E. coli*, e ignorar raras colônias de *Staphylococcus* coagulase negativo, ou de estreptococos alfa hemolíticos, corineformes, quando bactérias potencialmente patogênicas forem isoladas.

Capítulo 5: Identificação

*Emerson Dangui Cavassin
Cássia Maria Zoccoli
Carlos Emílio Levy*

5.1 Meios de cultura

O crescimento dos micro-organismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a sua identificação. É importante conhecer o potencial de crescimento de cada meio de cultura e adequar ao perfil bacteriano esperado para cada material.

- Ágar sangue (AS) – meio rico e não seletivo, diferencial para a hemólise, nele crescem a maioria dos Gram-negativo e Gram-positivo, além de fungos filamentosos (bolores) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros fastidiosos.
- Ágar chocolate (AC) – meio rico e não seletivo, permite o crescimento da grande maioria das bactérias aeróbias e facultativas. Quando incubado em CO₂ dá suporte também ao crescimento dos microaerófilos. Pode-se observar halos esverdeados com colônias alfa-hemolíticas
- Ágar MacConkey (MC) – meio seletivo para Gram-negativo e diferencial para a utilização de lactose. Deve inibir o crescimento de micro-organismos Gram-positivo.
 - Lactose positiva – coloração avermelhada
 - Lactose negativa – coloração inalterada
 - Como exceção, eventualmente, podem crescer *Enterococcus*, *Candida* e *Bacillus*.
- Ágar Salmonela-Shigella (SS) – meio seletivo para *Salmonela* e *Shigella* e diferencial para a utilização de lactose (coloração rósea) e produção de H₂S (coloração negra).
- Ágar Hecktoen Enteric (HE) – meio seletivo para *Salmonela* e *Shigella* e diferencial para a utilização de lactose (coloração alaranjada) e produção de H₂S (coloração negra).
- Ágar Thayer Martin Modificado (TMM) – meio seletivo pela adição de colistina, vancomicina e nistatina inibe crescimento de enterobactérias, Gram-positivos, fungos e algumas espécies de *Neisserias* saprófitas. Enriquecido com a adição de complementos para a recuperação de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*

Vide módulo de meios de cultura para características de outros meios.

5.2 Coloração de Gram

- Deve-se realizar a coloração de Gram para todas as colônias crescidas em meios não seletivos quando o aspecto deixar dúvidas quanto a sua classificação.
- Com uma agulha microbiológica estéril, pegar pequena porção de uma colônia isolada e passar para uma lâmina limpa e identificada.
- Para facilitar a leitura, pode-se homogeneizar o material com uma gota de solução salina estéril em movimentos centrífugos.
- Aguardar para que seque e fixar rapidamente sobre a chama.
- Correlação entre as principais bactérias de importância clínica e os tipos morfo-tintoriais:

5.2.1 Gram-positivos

Cocos	<ul style="list-style-type: none"> • Cadeias longas – estreptococos aeróbios e anaeróbios • Cachos – estafilococos e peptococos (anaeróbio). • Cachos e tétrades – <i>Micrococcus</i>, <i>Stomatococcus</i>, <i>Aerococcus</i> spp. • Aos pares – <i>Enterococcus</i>
Coco-bacilo (podem formar cadeias curtas)	<ul style="list-style-type: none"> • Gram variável – <i>Gardnerella</i> • Em chama de vela – <i>S. pneumoniae</i> • Retos e curtos – <i>Lactobacillus</i>, <i>Erisipelotrix</i>, <i>Listeria</i>, <i>Rhodococcus</i>
Bacilos	<ul style="list-style-type: none"> • Ramificados – <i>Nocardia</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Actinomyces</i>, • <i>Propionibacterium</i> (anaeróbio) • Difteróides – <i>Corynebacterium</i> • Esporulados – <i>Bacillus</i>, <i>Clostridium</i>

5.2.2 Gram-negativos

Cocos (visualizados aos pares)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Neisseria</i>, <i>Moraxella</i>, <i>Branhamella</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Veillonella</i> (anaeróbio).
Coco-bacilo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Haemophilus</i> (pleomórfico, ora coco-bacilo, ora bacilo), <i>Brucella</i>, • <i>Bordetella</i>, <i>Pasteurella</i> e os anaeróbios <i>Actinobacillus</i>, <i>Bacteroides</i>. • Curvos – <i>Campylobacter</i>, <i>Helicobacter</i>, <i>Vibrio</i>, <i>Mobiluncus</i> • Helicoidais – <i>Arcobacter</i> e <i>Borrelia</i>. <i>Leptospira</i> e <i>Treponema</i> (não visíveis ao Gram) • Retos – Enterobactérias, não fermentadores • Extremidades afiladas – <i>Fusobacterium</i> (anaeróbio)
Bacilos	<ul style="list-style-type: none"> • Extremidade bifurcada – <i>Bifidobacterium</i> (anaeróbio)

5.3 Esquema geral de identificação bacteriana

5.3.1 Crescimento bacteriano

- Observar as características das diferentes colônias crescidas em cada meio de cultura utilizado. Lembrar que o tamanho das colônias de um mesmo agente pode ser variável, conforme a proximidade com outras colônias.
- Por exemplo, semeadura em Ágar sangue (AS) e Mac Conkey (MC):
 - Observar quantos tipos de colônia cresceram em cada ágar.

- As colônias que cresceram somente em AS devem ser de micro-organismo Gram-positivo ou mais exigente.
- Todas as colônias presentes no MC, micro-organismos Gram-negativo, devem apresentar correspondente no AS.
- A escolha dos meios utilizados para cada material deve estar relacionada aos agentes esperados.

Crescimento dos micro-organismos nos principais meios de cultura utilizados na rotina

Mais provável	Ágar Chocolate	Ágar Sangue	CLED	Mac Conkey	Salm.- Shigella	Caldo TIO
Gram-negativo, leveduras e enterococo	+	+	+	-/+	-/+	+
Gram-positivo	+	+	+	-	-	+
Gram-negativos exigentes	+	+	-	-	-	-
Haemophilus	+	-	-	-	-	-
Anaeróbios	-	-	-	-	-	+*

+ Meio dá suporte ao crescimento

- Meio não dá suporte ao crescimento

* Principalmente em coluna alta

Optar entre o crescimento a ser valorizado e o que deverá ser ignorado

- Muitas vezes é impossível definir o significado clínico de um isolado sem conhecer previamente sua identificação.
- Todo crescimento deve ser avaliado e classificado como:
 - patógeno em potencial ou provável contaminante.
- Para tanto, deve-se reunir evidências microbiológicas, clínicas e epidemiológicas:
 - conhecer os principais patógenos esperados para cada material biológico, bem como a respectiva microbiota (flora normal);
 - obter o máximo de informações sobre o quadro clínico apresentado (sinais, sintomas, diagnóstico e doença de base);
 - os componentes da microbiota residente (*Micrococcus*, *Estafilococos* coagulase negativo, *S. viridans*...) apresentam menor valor preditivo positivo como agentes infecciosos, sendo de fácil interpretação na maioria dos casos. Entretanto, em condições específicas podem participar como agentes patogênicos. Por exemplo: duas ou mais hemoculturas periféricas com *S. viridans* ou outros potenciais contaminantes podem ser consideradas como possível diagnóstico de bacteremia por esses agentes, devendo ser investigada a possibilidade de endocardite, ou ainda colonização de cateter.

- Observar se a cultura é pura ou se existem diferentes tipos de colônias, nesse caso, se há predomínio de um tipo e dependendo da topografia se o agente pode ser considerado potencial patógeno ou contaminante.
- As culturas puras apresentam maior valor preditivo positivo para diagnóstico (trato urinário, secreções de feridas, etc), no entanto em sítios intensamente colonizados como por exemplo cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Candida* em coprocultura, uma provável interpretação seria o comprometimento da microbiota pelo uso de antimicrobianos. No caso cultura pura de *S.viridans* em swab de orofaringe representa a microbiota habitual.
- Sempre que possível, deve-se traçar um paralelo entre os achados da bacterioscopia direta do material e o resultado da cultura, buscando:
 - Valorizar achados de cultura – bacterioscopia com predomínio de cocobacilos pleomórficos em LBA e isolamento de *Haemophilus* em cultura, ainda que em baixas contagens por dificuldades de crescimento.
 - Definir contaminantes – presença de abundantes células epiteliais na bacterioscopia da urina não centrifugada ou em escarro, denotando a contaminação com a microbiota local.
 - Detectar falhas nas condições de coleta e/ou processamento laboratorial e uso de antimicrobianos– Bacterioscopia de líquido, líquido articular ou secreção conjuntival com diplococos Gram-negativo aos pares intracelulares e cultura negativa.
 - Caracterização de infecção por anaeróbios – cultura negativa com bacterioscopia revelando micro-organismos com características morfológicas de anaeróbios.
 - Quantificação – em culturas quantitativas os achados da bacterioscopia direta devem coincidir com as contagens obtidas em cultura (urocultura, LBA, aspirado traqueal).

5.3.2 Coloração de Gram das colônias isoladas

- Sempre que utilizar meio não seletivo.
- Quando utilizar meios seletivos e desejar confirmar a concordância entre a classificação morfo-tintorial e o meio utilizado.
- Para verificar a presença de leveduras, nesse caso o exame direto com sãlina é suficiente.

5.3.3 Direcionamento da identificação

- De acordo com o crescimento em meio seletivo e o resultado da bacterioscopia, seguir a rotina específica.

Consultar Módulo V para identificação de bactérias de interesse médico.

Capítulo 6: Interpretação de Resultados e Laudos

*Emerson Dangui Cavassin
Carlos Emílio Levy
Ângela Von Nowakovsky*

6.1 Introdução

O microbiologista ao elaborar os relatórios de exames microbiológicos deverá ter em mente o fato de que o clínico poderá não saber interpretá-lo adequadamente, tanto por desconhecer um determinado nome de bactéria, como seu potencial patogênico e sua relação com o local de isolamento, e porque muitas vezes essas dúvidas associadas à disponibilidade do antibiograma possam ser um fator determinante do uso inadequado de antimicrobianos.

Cabe ao microbiologista elaborar um laudo claro e objetivo, facilitando a comunicação com o corpo clínico, diretamente (telefone ou pessoalmente), ou encorajando-o a procurar o laboratório para discutir casos ou participar de reuniões, visitas de enfermaria, etc. São atividades pertinentes e relevantes a elaboração de manuais de coleta, informes sobre perfil de bactérias mais isoladas e padrões de sensibilidade (por material [hemoculturas, urina, ferida cirúrgica, etc.], por especialidade, etc.), em atividade conjunta com a CCIH.

Esclarecendo novos padrões de relatórios, novos agentes, seu potencial patogênico, mudanças de padrões (p. Ex. de antibiograma), disponibilidade de recursos diagnósticos e orientação terapêutica (ex. E-test, testes rápidos com látex para pesquisa de antígenos, etc.).

O microbiologista deve ter em mente os principais agentes etiológicos envolvidos nas principais topografias, bem como da respectiva microbiota (flora normal), para adequada interpretação dos resultados.

Cabe ao microbiologista ainda:

- Tomar iniciativa de procurar o médico responsável pelo paciente para esclarecer dúvidas sobre exames e materiais ou quando possível por intermédio da enfermeira ou médico da CCIH.
- Estimular e envolver a enfermeira e o infectologista da CCIH ou clínico para a comunicação rápida dos resultados de bactérias resistentes, dos exames relacionados com diagnóstico de infecção relacionada à assistência à saúde, dos exames de urgência como de LCR, hemocultura, etc., do diagnóstico de doenças de notificação compulsória ou que exijam isolamento, etc.
- Em resumo, mais do que um retrato do crescimento nas placas de Petri, o laudo microbiológico deve, sempre que possível, ser o resultado de uma leitura interpretativa e crítica, fruto da comunicação e interação entre o laboratório de microbiologia e o médico.

6.1.1 Análise microbiológica

- O microbiologista na sua rotina diária para decidir a importância das bactérias ou fungos isolados deve considerar o potencial patogênico do agente, a bacterioscopia e o pedido médico.
- Bactérias como *S. pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycobacterium tuberculosis*, independentemente do material em que foram isoladas, são de importância clínica e epidemiológica.
- Bactérias como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, se forem isoladas no LCR ou sangue, são de importância indiscutível, mas quando isoladas em mucosas costumam representar microbiota normal (flora) e seu relato é discutível.

6.1.2 Algumas sugestões importantes

- Como norma, não se deve identificar e fazer antibiograma de bactérias da microbiota de pele e mucosas. No entanto, é sempre conveniente entender as sugestões que se seguem como sujeitas a revisões conceituais e atualizações:
 - Conversar com o médico do paciente ou com o médico da CCIH ou mesmo com o paciente se indicado.
 - Quando não for possível a comunicação, relatar os achados da bacterioscopia, se realizada, com identificação sumária (bacilos ou coco-bacilos não fermentadores), ou ao nível de gênero (enterobactérias e alguns Gram-positivos), se o estafilococo é *aureus* ou coagulase negativo, etc.
 - Conservar a bactéria por um prazo de 5 a 7 dias deixando a possibilidade de prosseguir nos testes caso necessário.
 - Estudos quantitativos são sempre que possível mais úteis que exames qualitativos, usando ou diluição do material ou semeando com alça calibrada.

- Relatórios quantitativos de bacterioscopia também podem ser muito úteis: número médio de bactérias anotadas no mínimo em 10 campos observados de imersão.
- Relatório denominado semiquantitativo de bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram, descrevendo e semiquantificando:
 - grupos morfológicos de bactérias presentes (cocos/bacilos/ Gram-positivos ou negativos) e caso haja o predomínio de um ou mais grupos; quando o microbiologista for experiente e o achado sugestível e compatível, recomenda-se adicionar o comentário “sugestivo de pneumococo, neisseria ou *haemophilus*”, para amostras de LCR, ou *Neisseria gonorrhoeae* em esfregaços uretrais, etc.
 - presença de bactérias intracelulares (neutrófilos ou fagócitos)
 - presença de fungos leveduriformes em brotamento e hifas, etc.
- Finalmente a discussão sobre os resultados de cultura de materiais provenientes de tecido cutâneo e mucosas, o que devemos relatar e fazer antibiograma e o que interpretar como microbiota contaminante (flora), são muito relativos, não havendo unanimidade para padrões definitivos de relatórios.

Como o resultado microbiológico deveria ser fruto de uma análise envolvendo evidências microbiológicas, clínicas e epidemiológicas, torna-se impossível estabelecer regras definitivas para elaboração de laudos, principalmente quando tratar-se de material de local não estéril.

Quando houver dúvida, recomenda-se consultar o clínico que solicitou o exame ou a CCIH.

Quando não forem possíveis essas opções, recomenda-se descrever a bacterioscopia, qualidade do material com base na relação células epiteliais e leucócitos, descrever a presença de potenciais patógenos ou contaminantes e solicitar, quando possível, nova amostra.

Vide o Módulo Principais Síndromes Infecciosas, para comentários específicos.

Relatório quantitativo de exame microscópico pela coloração de Gram

Descritivo	Classificação numérica
Nr. médio de bactérias, células epiteliais, leveduras, neutrófilos/campo	1.000x
Ausente	0 0
Raros +	1-5
Frequentes ++	6-15
Numerosos +++	16-30
Incontáveis ++++	>30

6.2 Laudo para hemocultura

Em caso de bacteremia, septicemia, ou febre a esclarecer, deve-se sempre que possível colher duas amostras de sangue venoso (periférico) de locais diferentes. Se o paciente tiver cateter, colher mais uma amostra obtida do cateter.

Bactérias isoladas no sangue periférico do tipo *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Candida albicans* têm elevado valor preditivo de infecção.

- Enterococos têm significância clínica em 80% dos casos.
- *Streptococcus viridans* entre 40 a 60%:
 - 1 cultura positiva em duas obtidas – é muito provável uma contaminação.
 - 2 ou mais culturas positivas – é muito provável a infecção.
 - 1 colhida e positiva. Colher nova amostra.
- *Staphylococcus* coagulase negativa entre 20 a 40%:
 - 2 amostras colhidas e positivas – verificar se são da mesma espécie ou se têm o mesmo antibiograma. Se diferirem na espécie e/ou nitidamente no antibiograma é provável que houve contaminação de coleta. Não liberar antibiograma.
 - 2 amostras colhidas e 1 positiva – solicitar nova amostra – provável contaminação. Não fazer antibiograma.
 - 2 amostras colhidas e identificadas como da mesma espécie e com mesmo antibiograma – Liberar resultado da cultura e antibiograma e destacar: "Bactéria da flora cutânea. Instituir tratamento específico se houver evidências clínicas de infecção. Se o paciente estiver com cateter, possível colonização."
- Outras bactérias isoladas de uma única amostra e sugestivas de contaminação: *Micrococcus* spp., corineformes, *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp.
- Hemoculturas positivas e repetidas para bactérias potencialmente contaminantes podem ser consideradas patogênicas quando afastada a contaminação por cate-

ter. Considerar a hipótese de endocardite. Quando houver suspeita de fastidiosos ou fungos ou micobactérias conservar as hemoculturas por 30 a 40 dias.

6.3 Ponta de cateter

- Fazer cultura qualitativa não se justifica para diagnóstico de bacteremia. Deve-se relatar o número de colônias isoladas e a(s) bactéria(s) isolada(s) pela técnica semi-quantitativa de Maki.
- Quando maior que 15 colônias, identificar, mas não fazer antibiograma. Se a hemocultura for positiva fazer antibiograma da hemocultura.
- No caso de bacteremia, a remoção do cateter e envio da ponta para cultura se justifica quando a amostra de hemocultura for colhida no prazo de 24 horas.
- Considerando que a colonização de cateter é muito comum, se não houver bacteremia, não se justifica identificar bactérias do cateter e fazer antibiograma, exceto se houver indicação de monitoramento dos cateteres pela CCIH. Caso a hemocultura seja negativa, não se justifica trabalhar com bactérias do cateter. As técnicas de investigação de contaminação da luz do cateter justificam-se quando se deseja descobrir fonte de bacteremia, fungemia, abscessos em múltiplos órgãos, etc.

6.4 Laudo para o trato respiratório superior – ouvido e ocular.

6.4.1 Orofaringe

É importante relatar os achados de bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram, descrevendo e quantificando a presença de:

- Células epiteliais
- Polimorfonucleares (neutrófilos) e/ou mononucleares (linfócitos)
- Principais grupos morfológicos de bactérias
- Presença de bactérias intracelulares (neutrófilos ou fagócitos)
- Presença de fungos leveduriformes / hifas
- Associação fuso-espirilar, quando presente

Patógenos a serem relatados em isolados de cultura:

- *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico do grupo A)
- *Arcanobacterium haemolyticum*
- *Bordetella pertussis*
- *Corynebacterium diphtheriae*

No caso da *Corynebacterium diphtheriae* e *Bordetella pertussis* encaminhar para Laboratório de Referência cepas isoladas para confirmação e notificar.

Laudos:

- Resultado sem patógenos: “Presença de bactérias da microbiota da orofaringe”.

No caso de paciente imunossuprimido, quando solicitado, cultura de vigilância e se houver predominância de bactéria ou fungo, relatar predomínio de: *P. aeruginosa*, *Candida spp.*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, etc.; nesses casos o antibiograma será feito apenas quando solicitado pela CCIH.

Obs.: Embora seja um tema polêmico na literatura, deve-se relatar o isolamento de pneumococo, *Haemophilus*, *N. meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* em orofaringe, nos casos em que:

- a bacterioscopia revelar predomínio de neutrófilos (ressalva em imunossuprimidos) e
- observar a presença do agente em neutrófilos/macrófagos e/ou
- crescimento abundante (nítido predomínio) em relação ao restante da microbiota
- houver pedido médico específico

Colocar a seguinte observação: “A(s) bactéria(s) isolada(s) fazem parte da microbiota da orofaringe, não sendo recomendável uso de antimicrobianos. Consultar infectologista para orientação.”

6.5 Nasal

O *swab* nasal ou de nasofaringe não tem valor diagnóstico para sinusite, otite ou infecções do trato respiratório inferior, não devendo ser processada para esses fins. Pode ser útil apenas para pesquisar portadores de *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* (beta hemolítico do grupo A).

6.6 Epiglote/Nasofaringe

No caso de epiglotite, no material de nasofaringe ou do local, podem ser isolados o *Haemophilus influenzae*, o pneumococo e o *Streptococcus pyogenes* e mais raramente o *S. aureus* como agente etiológico. No caso de coqueluche, deve-se pesquisar a *Bordetella pertussis*.

Relatar o resultado positivo ou negativo para *Haemophilus influenzae*, pneumococo, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Bordetella pertussis* quando pesquisados e se foram empregados meios seletivos para a tentativa de isolamento.

6.7 Seios da face

Culturas de aspirados intraoperatórios ou obtidas por punção devem ser relatadas:

- Bacterioscopia – relato quantitativo de bactérias, fungos, neutrófilos e células epiteliais.
- Cultura dos agentes isolados e se houver predomínio de algum (são esperados o pneumococo, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes* e mais raramente o *S. aureus*).
- Caso seja sugestivo de contaminação com secreção de nasofaringe (muitas células epiteliais, poucos neutrófilos) relatar: “sugestivo de contaminação com microbiota de nasofaringe”.
- É aconselhável em sinusite subaguda e crônica a cultura para anaeróbios. Quando realizada relatar o resultado. Quando não realizada, comparar a bacterioscopia com o resultado da cultura e relatar a possibilidade de participação de bactérias anaeróbias (observadas no Gram, mas que não crescem em aerobiose).

A rino-sinusite infecciosa aguda e não complicada na maioria das vezes é de etiologia viral.

Destacam-se as seguintes particularidades:

- Em imunossuprimidos e diabéticos valorizar o achado de fungos filamentosos do tipo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., fungos dematiáceos e zigomicetos (*vide* Módulo de Micologia)
- Em pacientes com entubação nasotraqueal ou nasogástrica > que 48 horas, o material pode revelar presença de enterobactérias, bactérias não fermentadoras, *S. aureus*, leveduras e polimicrobiana, agentes potencialmente relacionados a pneumonias hospitalares.

Devem ser relatados, mas para serem valorizados deve haver clínica ou evidência radiológica e material representativo. O aspirado traqueal deve ser solicitado para cultura quantitativa.

6.8 Ouvido

6.8.1 Otite externa:

- relatar o resultado da bacterioscopia e fazer identificação e antibiograma caso a bacterioscopia de respaldo (abundantes neutrófilos e predomínio do tipo morfológico isolado na cultura de potencial patógeno) ao isolamento de uma enterobactéria, *S. aureus* ou *Pseudomonas* e eventualmente fungo.

6.8.2 Otite média:

- Culturas de materiais obtidos por timpanocentese (miringotomia) são ideais, mas raros, e devem ser relatados os achados de bacterioscopia e cultura com antibiograma do potencial patógeno.
- *Swabs* ou aspirados de conduto auditivo em membranas previamente rompidas têm pouco ou nenhum valor diagnóstico. Sugere-se não coletar esse tipo de material.
- Quando realizada a cultura, havendo crescimento de bactérias da microbiota (Gram-positivos, *Neisserias* saprófitas, enterobactérias, etc.) relatar: “presença de bactérias da flora do conduto externo”.
- Se a bacterioscopia revelar predomínio de um tipo morfológico, com abundantes neutrófilos e predomínio na cultura de um agente, relatar: microscopia do esfregaço corado pelo Gram com relatório quantitativo dos elementos celulares (células, bactérias e neutrófilos) e resultado da cultura, ficando o antibiograma a critério médico.

Resultado positivo da cultura, quando o agente isolado for *Haemophilus*, Pneumococo ou *M. catarrhalis*, deve-se relatar o agente isolado e o antibiograma.

No caso de mastoidite a indicação é obtenção cirúrgica de fragmentos ósseos para cultivo e não a cultura de secreção de ouvido externo/médio. Poderá ser relatado o cultivo desse material quando a bacterioscopia for concordante e a bactéria isolada for:

Aguda: *Haemophilus*, pneumococo, *S. pyogenes* e *S. aureus* – fazer antibiograma.

Crônica: Enterobactérias, *Pseudomonas*, *S. aureus*.

Quando isolar *Staphylococcus* coagulase negativa, *S. viridans*, *Corynebacterium*, etc, em flora mista, relatar: “presença de bactérias da flora do conduto auditivo externo” e não fazer antibiograma.

6.9 Laudo para ocular

- Os potenciais patógenos devem ser distinguidos dos potenciais contaminantes de mucosas, sendo o recurso mais simples a bacterioscopia do material, quando necessário concentrado, fazendo-se uma suspensão do *swab* em salina e centrifugado em cito-centrífuga. No entanto, é comum a bacterioscopia ser inconclusiva, tanto pela dificuldade de caracterizar a bactéria como pelas outras etiologias (vi-

ral, *Chlamydia trachomatis*, alérgica, química, uso prévio de colírios com antibióticos, etc.).

- Infecções de glândula lacrimal, ordéolo e blefarite podem envolver amostras de *S. aureus*.
- Conjuntivite bacteriana pode ser atribuída à *N. gonorrhoeae* em recém-nascidos. A presença de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* são outras possibilidades etiológicas.
- Isolamento de bactérias como *S. aureus* ou os outros agentes relacionados, concordantes ou não com a bacterioscopia, mas com presença de leucócitos e com predomínio de crescimento da cultura, deve ser relatado e realizado o antibiograma.
- Úlcera de córnea pode envolver *P. aeruginosa* e outros oportunistas inclusive fungos filamentosos e protozoários (*Acanthamoeba*). Cautela no caso de isolamento de *Neisseria saprófita*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp. e outros potenciais habitantes de mucosas. Comparar sempre o resultado da bacterioscopia com a quantidade de bactérias isoladas, se houve crescimento puro ou quase puro.
- Relatar: cultura positiva para bactéria da microbiota de mucosas – sem valor diagnóstico. Sugerir nova coleta.
- Microbiota considerada normal em conjuntiva: *Staphylococcus coagulase negativa*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Moraxella* spp., *Haemophilus influenzae* e fungos filamentosos.
- Endoftalmite envolve bactérias potencialmente patogênicas como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, pneumococo, *Haemophilus* spp., *N. meningitidis*, e outros agentes relacionados a fatores predisponentes como imunossupressão, diabetes, trauma, cirurgia, endocardite, bacteremia, etc.
- O material deverá ser obtido por punção e evitar contaminação. Eventualmente anaeróbios e fungos podem estar presentes. O exame microscópico poderá ajudar a evidenciar o agente e orientar o meio de cultura mais adequado ou apenas o resultado da cultura poderá revelar o agente, que poderá ser um dos listados acima.
- No caso de potenciais contaminantes que crescem em pequena quantidade, sem respaldo da bacterioscopia, identificar o agente e relatar: “bactéria da flora de mucosas, papel patogênico duvidoso”. Guardar a bactéria por sete dias para eventual teste de sensibilidade.

6.10 Trato respiratório inferior

6.10.1 Laudo para escarro

- O escarro é útil para diagnóstico de tuberculose e para os agentes de algumas micoses pulmonares (paracoccidioidomicose, histoplasmose, criptococose). Pode ser valorizado o agente isolado quando houver corres-

pondência na bacterioscopia e quando houver poucas células epiteliais, numerosos leucócitos e quadro clínico compatível (pneumonia, bronquiectasia, fibrose cística ou mucoviscidose).

- Quando a bacterioscopia revelar mais de 10 células epiteliais por campo de pequeno aumento (objetiva de 10x), havendo predomínio sobre leucócitos e sem um tipo morfológico predominante, relatar:
 - “material com sugestiva contaminação de flora de orofaringe. Exame de valor diagnóstico prejudicado”. Não processar o material e solicitar nova amostra.
- Processar o material que revele menos de 10 células epiteliais, quando houver predomínio de leucócitos e predomínio de um tipo morfológico de bactéria. Os agentes bacterianos esperados em pneumonia aguda da comunidade são: *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae* e *S. aureus*.

6.11 Laudo para aspirado de secreção traqueal

6.11.1 Relatório

- Valores de corte de $\geq 10^6$ UFC/mL são utilizados. Quando aprovados no critério de adequação do material podem ser identificados e realizado o teste de sensibilidade até para dois micro-organismos isolados em contagens de $\geq 10^6$ UFC/mL. O exame deverá ser valorizado pelo clínico apenas se houver outras evidências (clínicas, radiológicas, etc) de pneumonia. Materiais com contagens inferiores a 10^5 UFC/mL, com 2 ou mais micro-organismos e particularmente se forem da microbiota oral (*Staphylococcus coagulase negativos*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria spp.*, etc,) com poucos leucócitos ou predomínio de células epiteliais são sugestivos de contaminação pela microbiota oral. Não identificar esses agentes e relatar: sugestivo de contaminação pela microbiota oral. Nessas condições, quando a contagem for muito baixa, relatar: cultura quantitativa negativa.
- Valores de $\geq 10^5$ UFC/mL podem ser utilizados quando houver troca recente de antimicrobianos ou quando houver solicitação médica ou da CCIH.
- Leveduras do gênero *Candida* devem ser interpretadas como prováveis contaminantes, pois o diagnóstico de pneumonia por *Candida* deve ser documentado por biópsia.
- Não tem valor diagnóstico de infecção do trato respiratório inferior o processamento de *swab* de secreção traqueal, não devendo ser processado para esse fim e solicitado o aspirado traqueal.

6.12 Laudo para lavado brocoalveolar ou escovado brônquico

São considerados junto com a biópsia pulmonar os materiais de melhor valor preditivo de isolamento do agente patogênico. É imprescindível a semeadura quantitativa para posterior contagem do número de colônias.

6.12.1 Relatório da bacterioscopia

- Descrever os achados da bacterioscopia do centrifugado, lembrando que será melhor quando feita em citocentrífuga.

Relatar:

- Relação células epiteliais/neutrófilos.
- Descrever presença de bactérias e, particularmente, se houver presença de micro-organismos fagocitados, quanto ao seu padrão morfo-tintorial (forma e reação ao gram) e se há predomínio de algum tipo.

6.12.2 Relatório da cultura

Culturas quantitativas de amostras do trato respiratório inferior, relatar:

- Contagem final do(s) micro-organismo(s) isolado(s).
- Quando isolar um ou até dois micro-organismos em contagens significativas (*vide* parâmetros abaixo), fazer antibiograma.
- Comentar: contagem bacteriana significativa – bom valor preditivo de infecção se a clínica for concordante.
- Quando as contagens não forem significativas ou mais de dois micro-organismos isolados e bacterioscopia com predomínio de células epiteliais sobre os leucócitos, relatar: “Presença de bactérias do trato respiratório superior” – sem valor diagnóstico.

Contagens bacterianas consideradas significativas:

- Escarro, aspirado endotraqueal, = 10^5 (pacientes em uso recente ou troca de antimicrobianos) ou 10^6 Ufc/mL
- Escovado brônquico protegido = 10^3 Ufc/mL
- Lavado broncoalveolar (BAL) = 10^4 Ufc/mL

6.12.3 *Candida* em secreções respiratórias

- A pneumonia causada por *Candida* spp. é considerada uma raridade e o diagnóstico só pode ser definido por biópsia pulmonar que revele invasão tecidual e não por cultura. É muito frequente a presença qualitativa de *Candida* spp. em todos os materiais obtidos de pacientes com cânula orotraqueal ou traqueostomia.
- O relato de isolamento de *Candida* costuma induzir a terapêutica desnecessária, com custo elevado, com efeitos colaterais e seleção de cepas re-

sistentes. Mesmo contagens significativas de leveduras devem ser consideradas com cautela, pois pode apenas representar colonização. Exceção deve ser feita aos recém-natos pré-termo e de baixo peso. Nestes, a mortalidade por candida apresenta níveis bastante elevados e a possibilidade de infecção invasiva deve ser considerada. Outros fungos como *Histoplasma* e *Cryptococcus* spp. devem ser identificados e relatados.

6.13 Laudo para pleural

Todo o cuidado deve ser tomado para evitar contaminação desse material. A bacterioscopia do sedimento centrifugado é muito útil para avaliar a presença de bactérias, micobactérias e eventualmente fungos, bem como as características da celularidade.

Alguns patógenos encontram-se em pequena concentração (*Haemophilus*, pneumococo, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*) ou mais raramente podem ser anaeróbios, fastidiosos ou fungos. Relatar o isolamento de bactérias potencialmente patogênicas (acima relacionadas). No caso de *Staphylococcus* coagulase negativo, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus viridans* e outras bactérias da flora cutâneo-mucosa é conveniente comparar com os achados da bacterioscopia e na dúvida contatar o clínico e solicitar nova coleta com antisepsia rigorosa.

6.14 Laudo para abscesso pulmonar

Os mesmos potenciais patógenos do derrame pleural podem estar presentes, incluindo os anaeróbios e fungos e somados às nocardias, micobactérias, *Bacillus anthracis*, etc.

O exame microscópico da amostra do material deve ser processado pela microbiologia e pelas técnicas histológicas. As colorações de Gram e Ziehl, exame direto com azul de algodão e se possível o Giemsa serão muito úteis na busca do agente etiológico e na sugestão de meios de cultura para semeadura, para orientar tempo de incubação, etc. Relatar o isolado se potencialmente patogênico.

Cautela na liberação de resultados de cultura se exames microscópicos forem negativos e a cultura revelar bactérias potenciais contaminantes de pele. Outras causas de abscesso devem ser consideradas (neoplasia, infarto, etc.).

6.15 Laudo para Líquido Céfalorraquidiano (LCR)

- Os agentes clássicos das meningites devem ser relatados bem como o respectivo antibiograma.

- A bacterioscopia deve ser relatada, mesmo sem resultado positivo de cultura, quando o microbiologista sentir confiança no diagnóstico ou com o comentário “sugestivo de”.
- No caso de isolamento na cultura de potenciais contaminantes de pele, em caso de meningite bacteriana sem fator predisponente (imunossupressão, cirurgia, etc) e bacterioscopia discordante ou negativa, relatar: o agente isolado, com o comentário: “potencial contaminante de coleta”. O antibiograma será realizado apenas a pedido médico.
- O cultivo de LCR realizado além do meio sólido, em caldo de cultura, aumenta muito a chance de isolamento de contaminantes. Não relatar potenciais contaminantes em culturas de LCR de meningite da comunidade, com bacterioscopia negativa e ausência de crescimento no ágar.
- LCR obtido pelo “shunt”: a maioria das infecções em pacientes com shunts, ou derivações são bactérias da flora cutânea como *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp., *Neisserias* saprófitas e *Acinetobacter* spp. Nesse caso, devem ser considerados e relatados. Eventualmente *Propionibacterium* spp. pode estar envolvido. Na dúvida, solicitar novo material para confirmação. Bactéria que cresce no caldo e não cresce no ágar, se não for fastidioso ou anaeróbio, em geral é contaminante.

6.16 Laudo para pele, abscessos profundos e feridas

- Abscesso em tecido subcutâneo.
- Abscesso cerebral, hepático, renal e outros órgãos sólidos.
- Abscesso intra-abdominal.

Embora sejam os três materiais abscessos, o microbiologista deve ter em mente expectativa de isolamento de diferentes agentes.

- Os abscessos fechados e puncionados com técnica asséptica são considerados materiais de bom valor preditivo diagnóstico quando revelam bactérias ou fungos.
- Deve-se, portanto, orientar o médico para obter material nas melhores condições de assepsia.
- Encaminhar rapidamente o material para o laboratório.
- Para abscessos considerar a possível participação de anaeróbios estritos ou microaerófilos. Quando disponível fornecer meio de transporte adequado, frasco estéril ou orientar para enviar o material na seringa sem agulha (muito usado e pouco recomendado por ser improvisado).
- Fazer esfregaço em lâmina para bacterioscopia, e, se indicado, exame direto para pesquisa de ameba, com KOH 10% para pesquisa de fungos, assim como pesquisa de BAAR para micobactérias em esfregaço corado pelo Ziehl.
- Nos abscessos de tecido subcutâneo e cerebral, a bacterioscopia pode dar orientação útil para escolha dos meios de semeadura ou ajudar no resultado. *S. aureus* é

a causa mais importante em abscesso subcutâneo, mas em caso de associação com mordida, os fastidiosos devem ser lembrados.

- No caso de abscesso cerebral, renal e hepático o diagnóstico correto e rápido é de extrema valia. O exame microscópico pode ser muito útil se revelar algum agente. Pode haver participação dos mais variados agentes como bactérias comuns, fastidiosos, fungos, nocardia, micobactérias, ameba, etc. Deve-se procurar semear no maior número de meios diferentes, inclusive em caldo tioglicolato.
- No caso de abscesso abdominal, a associação de enterobactérias com anaeróbios é esperada. Dependendo da história clínica, lembrar de *Salmonella* e *Yersinia*.
- No caso de abscesso de tecido subcutâneo o resultado ideal é quando concordante com a bacterioscopia e revelando agente potencialmente patogênico. O *S. aureus* e *Streptococcus* beta hemolíticos causam mais celulite, mas podem ser isolados em abscessos, sendo as enterobactérias raras, exceto em ferida cirúrgica, cateter e outras infecções relacionadas à assistência à saúde associadas a procedimentos invasivos.
- No caso da cultura revelar bactérias da microbiota, mas concordante com a bacterioscopia (*S. viridans*, *Staphylococcus* coagulase negativo, corineformes, etc.), liberar o resultado com o antibiograma.
- No caso de bacterioscopia negativa ou discordante e, principalmente em abscesso drenando há alguns dias, liberar o resultado relatando a possibilidade de contaminação; guardar a bactéria por sete dias e não fazer o antibiograma.
- No caso de abscesso cerebral, hepático, renal, etc., se o exame microscópico revelar possível agente, o clínico deve ser imediatamente comunicado e informado do andamento dos exames de cultura.
- Tanto bactérias potencialmente patogênicas como da microbiota de pele ou mucosas podem ser isoladas em abscesso cerebral. Identificar as primeiras e fazer antibiograma.

Se houver concordância com a bacterioscopia das potenciais contaminantes, também identificar e fazer antibiograma. A pedido médico o teste de sensibilidade dessas últimas também poderá ser feito, mesmo sem bacterioscopia positiva.

- Os abscessos abdominais polimicrobianos da comunidade em geral respondem à terapêutica empírica e não exigem a identificação de todas as bactérias anaeróbias estritas. Importante relatar, quando isolar enterococos, enterobactérias ou bactérias não comuns; nesses casos indica-se identificar os agentes isolados e fazer o antibiograma.

6.16.1 Ferida / Lesão cutânea

Em geral, esses materiais são obtidos de feridas de origem na comunidade. O relatório de cultura de ferida aberta ou lesão depende muito de saber sobre a

representatividade do material e se a coleta foi adequada removendo secreções superficiais ou não.

Relatar quando isolar *S. pyogenes*, *S. aureus* e fastidiosos em condições clínicas concordantes (mordida, acidente com água, terra, etc.).

- Enterobactérias e *Pseudomonas* podem ser agentes contaminantes ou patogênicos. Deve-se relatar o achado, mas colocar como ressalva a possibilidade de contaminação, especialmente em úlceras de pressão, flebopáticas e outras crônicas.
- *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus* coagulase negativo, corineformes, etc., sugerem contaminação. Há maior possibilidade de isolamento de potencial agente patogênico quando são atendidos os seguintes requisitos:
 - Coleta bem feita.
 - Bacterioscopia concordante com a cultura.
 - Ocorrem muitas colônias de uma mesma bactéria, isoladas em cultura pura ou em nítido predomínio.

6.16.2 Ferida cirúrgica

São esperadas bactérias endógenas ou tipicamente de origem hospitalar (Enterobactérias, *S. aureus*, *Pseudomonas*, etc). Para o relatório de cultura e indicação de antibiograma deve-se contar com coleta bem feita, e os resultados devem ser comunicados à CCIH.

Nesse caso, infecções polimicrobianas são comuns, devendo-se considerar os gêneros predominantes.

Deve-se guardar as cepas isoladas por período maior (mínimo 30 dias) para eventual investigação de surto e fazer antibiograma com atenção para pesquisa de bactérias multirresistentes.

6.16.3 Dreno / Fístula

São materiais que não deveriam ser coletados, pois na maioria das vezes representam colonização dos drenos. Mesmo fístulas de osteomielite não são adequadas.

Nos casos em que a bactéria encontrada já tenha sido isolada de procedimento com menor risco de contaminação (biópsia, punção, etc.) e persistir, relatar o achado e fazer antibiograma. Para os demais casos relatar os gêneros que predominaram na cultura, sem antibiograma e que representam possível

contaminação. Considerar que fístulas espontâneas em pacientes da comunidade podem revelar presença de micobactérias, infecções fúngicas, actinomicose, etc.

6.17 Biópsia

As biópsias devem seguir critérios cirúrgicos de antisepsia. Assim representam material de bom valor preditivo diagnóstico. O material deverá em condições assépticas ser triturado em gral e semeado qualitativa e quantitativamente para posterior cálculo aproximado do conteúdo bacteriano por grama de material. Utilizam-se as seguintes amostras: biópsia de tecido, material de queimadura, material ósseo.

- Condições que dão segurança para liberação do resultado e antibiograma:
 - Condições adequadas de coleta, transporte e processamento preliminar.
 - Bacterioscopia concordante com achados de cultura.
 - Cultura pura ou predomínio de algum germe em particular.
 - Contagens $>10^4$ UFC/g tecido.
- Para os demais casos:
 - Bacterioscopia negativa ou discordante.
 - Culturas polimicrobianas.
 - Isolamento de bactérias da flora cutâneo-mucosa (*Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, corineformes, *Neisseria* spp., etc).
 - Baixas contagens $< 10^4$ UFC/g de tecido; relatar o(s) agente(s) isolado(s), sua contagem sem antibiograma e guardar a(s) bactéria(s) por sete dias.

6.17.1 Gânglio

O gânglio quando infectado pode revelar agentes importantes de doenças localizadas ou sistêmicas de origem: bacteriana (incluindo os fastidiosos), raramente anaeróbios, micobactérias, fungos, protozoários e vírus.

Cabe ao laboratório aproveitar ao máximo o material para diagnóstico, priorizando as culturas e se possível dirigindo os exames para a(s) suspeita(s) clínica(s).

Uma parte será enviada para estudo histológico e o restante do material deverá ser triturado e realizado exame microscópico (Gram, direto com KOH 10%, Giemsa) e culturas para bactérias (em meios ricos), fungos e micobactérias; caldo BHI com suplemento (pode ser o frasco de hemocultura) e tioglicolato com suplemento.

Procurar identificar o gênero e a espécie com segurança e na dúvida encaminhar ao laboratório de referência. No caso de isolamento de bactérias da flora cutâneo-mucosa e sem correlação com a bacterioscopia, relatar o achado sem antibiograma e guardar a bactéria por sete dias.

6.18 Laudo para genital

6.18.1 Uretral

Os principais agentes etiológicos das uretrites estão bem estabelecidos:

- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Mycoplasma* spp.
- *Ureaplasma* spp.
- *Herpes simplex* (vírus)

Mais raramente:

- *Trichomonas vaginalis*
- *Haemophilus* spp.
- outros

Colher sempre lâmina para bacterioscopia:

- *Trichomonas*: colher urina e centrifugar para fazer pesquisa no sedimento imediatamente após a coleta.
- *Chlamydia*: o diagnóstico melhor é imunológico (Imunofluorescência).
- *Mycoplasma* e *Ureaplasma*: existem meios específicos e kits muito práticos com cultura semiquantitativa por avaliação visual de mudança de cor.

No resultado da cultura é importante comparar com a bacterioscopia e estar alerta para não dar falsos resultados de *N. gonorrhoeae* confundindo com *Neisserias* saprófitas e *Acinetobacter*.

Quando isolar *Staphylococcus* coagulase negativo ou outras bactérias da flora genital relatar:

- “Presença de bactérias da flora genital”, não fazer antibiograma. Sugerir, quando não realizado, a pesquisa de *Chlamydia* e *Mycoplasma*.

- Quando isolar enterobactérias, *Enterococcus* em cultura pura ou em grande quantidade e for concordante com a bacterioscopia, relatar o isolamento com antibiograma, com o comentário: “Bactéria raramente isolada como agente de uretrite; sugerimos investigar outras causas como *Chlamydia*, *Mycoplasmas*, *Trichomonas* e afastar a possibilidade de prostatite, infecção urinária ou contaminação com corrimento vaginal”.

6.18.2 Vaginal

As principais causas de vaginite são: vaginose, *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*. Em meninas e pacientes na menopausa ou deficientes hormonais, enterobactérias, *S. aureus* e mesmo bactérias da flora podem eventualmente estar relacionadas com a sintomatologia.

A bacterioscopia é sempre útil para observar:

- presença de leveduras,
- presença e quantidade de neutrófilos,
- presença e predomínio de lactobacilos (microbiota normal) ou distorção com predomínio de outras bactérias,
- presença de *Gardnerella* spp., *Mobiluncus* spp. e outros anaeróbios que caracterizam a vaginose, associados às “clue cells” (células características do epitélio vaginal abarrotadas de bactérias).

Diagnóstico de vaginose bacteriana

A partir da coleta de secreção vaginal obtida em fundo de saco, pode-se avaliar ao gram a celularidade da amostra e os micro-organismos presentes. Podemos utilizar a simples descrição e quantificação desses elementos ou também classificá-los criando um *score*, como o definido pelo gradiente de Nugent. Desta maneira é possível alcançar maior padronização na leitura da bacterioscopia entre diferentes leitores na definição de quadros de vaginose bacteriana (referência Nugent).

De acordo com o gradiente de Nugent a população microbiana é classificada e define pontuações. O *score* final indica a correlação com o quadro clínico apresentado que varia entre microbiota vaginal normal, microbiota vaginal alterada (intermediário) e vaginose bacteriana.

Tabela 1 Sistema de pontuação (0 a 10) para esfregaço de secreção vaginal corado pelo método de Gram

Lactobacilos	Score	Gardnerella/ Bacteroides	Score	Mobiluncus	Score
Numerosos	0	Ausente	0	Ausente	0
Frequentes	1	Raros	1	Raros	1
Alguns	2	Alguns	2	Alguns	1
Raros	3	Frequentes	3	Frequentes	2
Ausente	4	Numerosos	4	Numerosos	2

Os morfotipos são quantificados de acordo com a média dos elementos observados em campos representativos do esfregaço por campo de 1000x (imersão). A pontuação total é resultado da quantificação de: lactobacilus + Gardnerella e Bacteroides + Mobiluncus.

Referencial:

- Ausente, ausência do morfotipo;
- Raros, <1 morfotipo/campo;
- Alguns, 1 a 4 morfotipos/campo;
- Frequentes, 5 a 30 morfotipos/campo;
- Numerosos, acima de 31 morfotipos/campo.

Interpretação do score obtido:

- 0-3 – flora vaginal normal
- 4-6 – flora vaginal alterada (intermediária)
- 7-10 – vaginose bacteriana

A cultura pode ser útil quando isolar *Candida* spp. e for caso de doença recidivante, sendo interessante a identificação de espécie, podendo ser necessário também o teste de sensibilidade.

A cultura está indicada nos casos de monitoramento de *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A, *Streptococcus agalactiae* e *Listeria* spp., associados a infecções do trato genital e aborto.

Quando a bacterioscopia for normal, com raros neutrófilos, presença de células epiteliais e lactobacilos e houver crescimento de raros Gram-positivos e/ou raras enterobactérias, relatar: "Presença de bactérias da flora vaginal normal"

Se isolar numerosas colônias de enterobactérias ou *S. aureus* e a bacteriocopia sugerir alteração de flora, relatar: “Presença de bactérias da flora vaginal com predomínio de: por exemplo, *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *S. aureus*, etc.” Não fazer antibiograma.

6.18.3 Endocervical

A cultura de secreção endocervical pode ser útil para isolamento de *N. gonorrhoeae* quando houver suspeita. Deve-se recomendar a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* nos casos de cervicite.

O isolamento de enterobactérias, enterococos, etc. pode significar alteração de microbiota por diferentes causas, mas o achado deve ser relatado, para consideração do médico. No caso da bacterioscopia revelar presença de frequentes, numerosos ou incontáveis neutrófilos (++ a ++++) e presença de bactérias com a morfologia e Gram concordantes com as bactérias encontradas na cultura, relatar: “Alteração da flora endocervical/vaginal com a presença das bactérias isoladas, lembrando que outras causas devem ser investigadas e/ou afastadas.

No caso de material endometrial e amniótico, fazer cultura para anaeróbios e bacterioscopia. No caso de não realizar cultura para anaeróbios, relatar a bacterioscopia e o resultado da cultura. Destacar a possibilidade de anaeróbios, quando forem visualizadas bactérias no Gram sem correspondente crescimento. Lembrar do papel potencialmente patogênico de *S. agalactiae*.

6.18.4 Esperma e/ou fluido prostático

Diagnóstico de prostatites

As Prostatites são um conjunto de quadros clínicos que se manifestam com uma combinação de sintomas urinários irritativos ou obstrutivos e dor perineal. Afetam principalmente homens na fase adulta e em menor número meninos pré-adolescentes. Dentre as classificações clínicas alguns quadros têm etiologia bacteriana e outros, os mais frequentes, são resultado de uma combinação de fatores inflamatórios não infecciosos ainda não totalmente compreendidos, espasmos da musculatura do diafragma urogenital ou ambos. O diagnóstico é essencialmente clínico e pode ser auxiliado pela microscopia e cultura da urina obtida antes e após massagem prostática.

Cultura de secreção prostática, urina pós-massagem prostática e esperma

Estes são os materiais clínicos processados no diagnóstico laboratorial de prostatites e orquiepididimite. Historicamente, é definido como padrão ouro para diagnóstico de prostatites o método dos quatro frascos de Meares e Stamey, de 1968 (referencia Meares), que avalia comparativamente urina e secreção prostática obtidas sequencialmente, conforme segue: frasco 1 colhe-se a urina de primeiro jato, frasco 2 com urina jato médio pré-massagem prostática, frasco 3 com líquido prostático pós-massagem e frasco 4 com o terceiro jato pós-massagem. O critério diagnóstico para prostatite bacteriana crônica consiste no resultado da cultura do líquido prostático (frasco 3) e/ou urina após massagem (frasco 4) com contagem superior a 5.000 ufc/mL. A contagem bacteriana no líquido prostático (frasco 3) e primeiro jato pós-massagem (frasco 4) devem ser pelo menos 10 vezes maior que a do primeiro e segundo jatos pré-massagem (frascos 1 e 2). Quando as culturas dos frascos 1 e 2 forem negativas qualquer contagem de culturas positivas nos frascos 3 e 4 precisam ser avaliadas com atenção. Devem ser utilizados agar sangue e agar Thayer Martin com incubação em microaerofilia.

Para orquiepididimite sugere-se coleta prévia de urocultura com jato médio seguida pela coleta do esperma. Considerar resultados da cultura de esperma com contagens maiores ou iguais a 5.103 ufc/mL para uropatógenos convencionais e qualquer contagem para *N. gonorrhoeae*. Avaliar os resultados para descartar infecção do trato urinário primária ou concorrente à orquiepididimite. Devem ser utilizados agar sangue e agar Thayer Martin com incubação em microaerofilia.

É aconselhável para elaborar um laudo adequado:

- Fazer bacterioscopia do esperma e da secreção prostática.
- Verificar contagem de leucócitos.
- Semear com alça calibrada de 10 µL e fazer contagem de colônias.
- Relatar os achados de bacterioscopia, contagem de leucócitos e bactéria isolada em contagens $\geq 10^3$ Ufc/mL. No caso de enterobactérias, enterococos e *Pseudomonas*, fazer antibiograma.

No caso de isolamento de estafilococos, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e outras bactérias da flora uretral, principalmente em prostatite crônica, sugerir a pesquisa de outros agentes (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Trichomonas*, vírus, etc.), sem liberar antibiograma.

6.19 Laudo para coprocultura

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

É incorreto emitir o resultado como “não foram isolados patógenos”, se as fezes foram cultivadas somente para recuperar alguns patógenos. O Laboratório deve listar apenas os agentes pesquisados na sua rotina ou quando especificado pelo clínico relatar o resultado sobre os agentes solicitados.

- Relatar: “Cultura negativa para os seguintes enteropatógenos pesquisados: *E. coli* clássica, *E. coli* invasora, *E. coli* O 147 EHEC, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp. (opcional), *Plesiomonas shigelloides* (opcional).
- Relatar pesquisa de leucócitos quando realizada pois dá suporte a infecções por *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*.
- No caso de realizar cultura para *Campylobacter* de rotina, incluí-lo no relatório.
- Diarreia com mais de sete dias de duração em imunocomprometidos pode ser por parasitas (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora belli* e em paciente com HIV, complexo do *Mycobacterium avium*).

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

Relatar o comprometimento da microbiota normal pela ocorrência de ausência da flora fecal Gram negativa e a presença de quantidade significativa de micro-organismos como *S. aureus*, leveduras e *Pseudomonas aeruginosa*, particularmente em pacientes hospitalizados e submetidos a uso prolongado de antimicrobianos. Lembrar que diarreia/enterocolite em pacientes com mais de 3 dias de hospitalização e fazendo uso de antimicrobianos pode ser por *Clostridium difficile*, devendo pesquisar a toxina com kits específicos.

Se as amostras fecais ou as cepas isoladas forem enviadas ao Laboratório de Referência para trabalho posterior, tais como pesquisa da presença de toxina de *C. difficile* ou sorotipagem de cepas de *Salmonella*, o relatório para os referidos exames deve incluir o nome do laboratório de referência e as provas realizadas (sorotipagem, determinação das toxinas, etc.)

Para maiores detalhes sobre o tema, consultar o módulo de principais síndromes infecciosas.

6.20 Laudo para urocultura

- Para a interpretação da urocultura, algumas informações são consideradas úteis:
- Se o(a) paciente apresenta sintomas de infecção urinária ou leucocitúria.
- Gestante, Idade/sexo.
- Tipo de coleta: jato médio, coletor, punção de sonda vesical em sistema fechado, punção suprapúbica, etc.
- Uso prévio de antibióticos à coleta da amostra, etc.

6.20.1 Urinas coletadas por jato médio

Quando essas urinas são submetidas a cultura sem informação clínica específica, sugere-se que contagens de colônias $< 10^5$ UFC/mL possam também causar infecção, somente se um único micro-organismo e potencial patógeno for isolado. Prováveis contaminantes são: difteróides, *Streptococcus viridans*, Lactobacilos, estafilococos coagulase negativa e outros que não sejam classificados como *Staphylococcus saprophyticus*.

As orientações descritas abaixo devem ser harmonizadas com o capítulo de síndromes clínicas (ITU).

Contagem de colônias $\geq 10^5$ UFC/mL:

- Um provável patógeno
 - Definitivamente identificar ao nível de espécie e realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
 - No caso de paciente assintomático solicitar nova amostra, pois se trata de provável bacteriúria assintomática.
 - No caso da presença de outras espécies em contagens $< 10^4$ UFC/mL, relatar número de micro-organismo(s) presente(s).
- Um provável contaminante (difteróides, *S. viridans*, lactobacilos, estafilococos coagulase negativa e outros que não sejam *Staphylococcus saprophyticus*.)
 - Realizar uma identificação limitada: por exemplo distinguir entre *S. saprophyticus* de outros estafilococos coagulase negativa, ou *Streptococcus agalactiae* (grupo B) de *Streptococcus viridans*. Não fazer antibiograma e sugerir nova coleta.
 - É raro, mas não impossível, ocorrer infecção urinária por bactérias da microbiota da uretra ou vagina. Para caracterizar ITU há necessidade de confirmar o achado com nova urocultura, e que esteja associada a sintomas. Sintomas e leucocitúria podem tornar muito provável o diagnóstico. Sem sintomas pode ser bacteriúria assintomática ou falha grosseira na coleta.
 - Enumerar outras espécies eventualmente presentes em $< 10^4$ UFC/mL.

- Dois prováveis patógenos (com um diagnóstico de infecção do trato urinário crônica ou recorrente)
 - Definitivamente identificar ao nível de espécie.
 - Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).

Dois prováveis patógenos (com sintomas de ITU)

- Identificar ao nível de espécie.
- Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
- Solicitar nova amostra para confirmação.

Mais que dois micro-organismos, reportar: “Múltiplos micro-organismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura.”

Contagem de colônias $\leq 10^5$ UFC/mL:

- Um provável patógeno
 - Para pacientes sob antibioticoterapia, grávidas, recém-nascidos, com infecção urinária de repetição, realizar identificação e teste de sensibilidade.
 - Um potencial patógeno presente em $> 10^2$ UFC/mL em mulheres sintomáticas e $> 10^3$
 - UFC/mL em homens sintomáticos, fazer identificação e antibiograma.
- Um provável contaminante
 - Leucócitos normais: descritivamente identifique o isolado.
 - Leucócitos aumentados: solicite nova amostra.

Mais que dois micro-organismos

- Relatar: “Múltiplos micro-organismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura.”

Sem informação clínica

- Descreva o micro-organismo presente entre 10^4 e 10^5 UFC/mL, com base na morfologia.
- Entre em contato com o paciente e/ou médico. Solicite informações e/ou a coleta de nova amostra.
- Caso o contato não seja possível, mantenha a cultura à temperatura ambiente por três dias para possível retomada de identificação, se requerido pelo médico do paciente.

6.20.2 Urinas coletadas por cateterização

Contagem de colônias $\geq 10^4$ UFC/mL:

- Dois ou mais prováveis patógenos:

- Realize a identificação e teste de sensibilidade de ambos os isolados.
- Descritivamente identifique as espécies presentes em $<10^4$ UFC/mL.

Um ou dois prováveis contaminantes:

- Reportar o(s) micro-organismo(s) presente(s) com descrição do tipo(s) morfológico(s),
- Exemplo, difteróides, *Streptococcus* do grupo viridans.
- Reportar: "Múltiplos micro-organismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."

Um provável patógeno e um provável contaminante:

- Identificar o provável patógeno e fazer antibiograma.
- Fornecer o tipo morfológico do provável contaminante.

Três ou mais micro-organismos:

- Fornecer uma descrição dos tipos morfológicos.
- Reportar: "Múltiplos micro-organismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."

Contagem de colônias $<10^4$ UFC/mL:

- Para pacientes sob antibioticoterapia, mulheres sintomáticas, homens sintomáticos, realizar identificação e teste de sensibilidade.
- Para todos os outros pacientes, forneça uma descrição do(s) tipo(s) morfológico(s) presente(s) e requeira nova amostra.
- Mantenha a cultura a temperatura ambiente por três dias para se necessário retomar o processamento de identificação se requerido pelo médico do paciente.

Obs.: Uroculturas com *Candida* provenientes de pacientes sondados são utilizadas como critério para a troca da sonda. Sugere-se nova coleta de urocultura após 24 horas. Caso o isolamento de *Candida* seja mantido, deve-se relatar, pois poderá haver necessidade de instituir terapia específica.

6.20.3 Urinas coletadas por punção suprapúbica

Um ou dois patógenos presentes:

- Identifique ao nível de espécie.
- Realize o teste de sensibilidade do provável agente patogênico.

Três ou mais patógenos presentes:

- Identifique.
- Mantenha a cultura por três dias para possível consulta.

Sem crescimento:

- Examine em até 48 horas de incubação.
- Reporte “Sem crescimento, teste com sensibilidade de > 10² UFC/mL em 48 horas” – (para semeadura de 10µl).

6.20.4 Observações

- Não realizar cultura de ponta de sonda vesical.
- Critério de positividade pode ser aplicado sempre que isolar $\geq 10^5$ UFC/mL de um só agente, devendo a presença de sintomas caracterizar a infecção do trato urinário e a ausência como bacteriúria assintomática.
- Realize pesquisa para anaeróbios somente em punções supra-púbicas, quando solicitado.
- Não realize de rotina o teste de sensibilidade diretamente da amostra de urina, embora em situações de urgência da disponibilidade do antibiograma isso possa ser feito.
- Em caso de dúvida na interpretação da urocultura, se possível, entre em contato com o paciente e/ou médico para maiores informações, conferindo as condições de coleta. Isso não sendo possível, relate o número de diferentes micro-organismos encontrados e sua contagem e solicite nova amostra.

6.21 Referências Bibliográficas

ARAUJO, M.R.E. Como pode ser feito o diagnóstico microbiológico das infecções relacionadas a cateter? In.: Microbiologia Clínica: 156 perguntas e respostas. MENDES, C.M.F. et al., São Paulo: Sarvier, 2005, p. 98.

BARENFANGER, J. Improving the clinical utility of microbiology data: an update. ClinMicrobiol Newsl, 25(1): 1-8, 2003.

BARON, E.J., WEINSTEIN, M.P., DUNNE JR, W.M., YAGUPSKY, P., WELCH, D.F., WILSON, D.M. Cumitech 1C, Blood Cultures IV. Coord. Ed. E.J. Baron: ASM Press, Washington D.C. 2005.

CLSI – Principles and Procedures for Blood Culture. Approved Guidelines. M47-A. Wayne, Pa. CLSI, 2007.

ESCHENBACH, D.A., POLLOCK, H.M., SCHACHTER, J. Laboratory diagnosis of female genital tract infection. Cumitech. Coord. Ed. S.J. Rubin: ASM Press, Washington, D.C., 1983

MEARES, E.M., STAMEY, T.A. Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. Invest Urol., v.5, n. 5, p. 492-518, Mar. 1968.

NUGENT, R.P., KROHN M.A, HILIER, S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J. Clin. Microbiol, v. 29, n. 2, p. 297-301, 1991.

OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica: Sarvier, São Paulo, 2010.

SACK, R.B., TILTON, R.C., WEISFELD, A.S. Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. Cumitech 12, Coord. Ed. S.J. Rubin: American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980.

SCHRECKENBERGER, P.C. Questioning dogmas: proposed new rules and guidelines for the clinical microbiology laboratory. American Society for Microbiology News, 67: 388-89, 2001.



**Acesse o site
da ANVISA**

Baixe o leitor de QR
Code em seu celular e
fotografe este código

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa
SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200
CEP: 71205-050
Brasília - DF
Telefone: 61 3462 6000

www.anvisa.gov.br
www.twitter.com/anvisa_oficial
Anvisa Atende: 0800-642-9782
ouvidoria@anvisa.gov.br