

Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica

Módulo III

ÍNDICE

1. Requisição de Exames Microbiológicos	1
Modelos para Requisição de exames Microbiológicos	1
Exames especiais de interesse da CCIH	4
2. Coleta, Transporte e Conservação de Amostra	5
Introdução	5
Aspectos básicos da coleta e do transporte de amostra	5
Instruções para Hemoculturas	7
Instruções para Ponta de Cateter Intravascular.....	9
Instruções para Ponta de Sonda Vesical	9
Instruções para Escarro.....	10
Instruções para Secreção Traqueal.....	10
Instruções para Aspirado Transtraquial (ATT)	10
Instruções para Lavado Bronco-Alveolar (BAL).....	10
Instruções para Secreção de Orofaringe.....	11
Instruções para Fluidos Orgânicos Estéreis	11
Instruções para Feridas, Abscessos e Exsudatos.....	12
Instruções para Amostras de Tecido Subcutâneo e Amostras de Pele	12
Instruções para Biópsia da Pele	13
Instruções para Tecido Ósseo	13
Instruções para Lesões Superficiais - coleta para fungos - micológico direto.....	13
Instruções para Secreção de Ouvido.....	13
Instruções para Secreção Ocular.....	13
Instruções para Material Genital	14
Instruções para Secreção Anal.....	16
Instruções para Fezes	17
Instruções para Urina.....	17
Instruções para Anaeróbios.....	18
3. Microscopia e coloração	20
Direto sem Coloração	20
Coloração de GRAM	21
Outras Colorações	25
4. Semeadura em meios de cultura	28
Material Clínico e os respectivos meios de cultura e microscopia	28
Procedimentos para SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA	30
5. Identificação	35
Meios de cultura	35
Coloração de Gram	35
Esquema geral de identificação bacteriana	36
6. Manutenção e estoque de culturas	38
Manuntenção das culturas	38
Estoque de culturas Bacterianas por ≥ 1 ano	39
Estoque de culturas Bacterianas por < 1 ano	40
Estoque de micobactérias por ≥ 1 ano	40
Estoque de micobactérias por < 6 meses	41
Estoque de cultura de fungos por ≥ 1 ano	41
Estoque de cultura de fungos por < 6 meses	42
Coleções de cultura.....	42
7. Referências bibliográficas	43

1. REQUISIÇÃO DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS

Deve-se lembrar que o envolvimento do médico com o laboratório de microbiologia pode com frequência ser muito útil para ambos, propiciando melhor orientação técnica, mais objetividade, facilitando a interpretação de resultados, etc.

A importância do relacionamento médico com o laboratório deve-se ao fato de que a microbiologia envolve etapas interpretativas para muitos exames. Por exemplo, aqueles que envolvem flora (mucosas), ou no caso de agentes específicos em que são fundamentais a escolha de meios seletivos, o uso de meios enriquecedores, o uso de suplementos, a ampliação do tempo de cultivo, a variação na temperatura de incubação, a adição de novos testes, etc.

O médico muitas vezes considera um desperdício de tempo o preenchimento de uma requisição de exame microbiológico.

O microbiologista ou responsável pela rotina deverá conferir as requisições ou pedidos de exame de cada material para verificar a existência de pedido.

Os itens abaixo servem apenas de roteiro para destacar informações que podem ser muito úteis e valorizadas em diferentes etapas do processamento do exame.

- Identificação clara do paciente (**modelo 1**)
- Informações sobre o paciente que são relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso (**modelo 2**)
- Descrição da amostra (**modelo 3**)
- Natureza do Teste Solicitado (**modelo 4**)

Fatores que podem comprometer o exame microbiológico:

- Hipótese diagnóstica mal elaborada.
- Informações mal colhidas, incompletas, ou não devidamente interpretadas, etc.
- Requisição inadequada da análise laboratorial.
- Coleta, conservação e transporte inadequados.
- Falhas técnicas no processamento da análise.
- Demora na liberação de resultado.
- Má interpretação dos resultados.

MODELOS PARA REQUISIÇÃO DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS

MODELO 1

Nome _____	Sobrenome _____	Iniciais _____
Registro n.º (do hospital ou serviço) _____		
Data de nascimento ____/____/____ (evitar confusão com homônimos e com a faixa etária)		
Sexo: M () F () (por exemplo, a interpretação de bacteriúria pode ser diferente para a mulher)		
Clínica () Leito () Ambulatório ()		
Campo para identificação do exame no Laboratório (número da análise microbiológica e seção do laboratório) _____		

MODELO 2

Hipótese diagnóstica _____

Dados clínicos (descrever objetivamente os achados clínicos mais significativos, lesões cutâneas ou de mucosas, local e características do sítio de infecção, etc.) _____

Dados epidemiológicos relevantes (viagem ou excursão, se vive em área endêmica de alguma doença infecciosa como malária, riquetsioses, cólera, etc.; doença ocupacional, por exemplo, contato com animais; acidentes - mordida, trauma, picada de carrapato, enchentes, etc.; envolvimento em surto de infecção hospitalar, etc.) _____

Outros dados laboratoriais importantes (dados laboratoriais que evidenciem o sítio do processo infeccioso: RX, tomografia, urina rotina, hemograma, etc.) _____

Provável origem do processo infeccioso: comunitário () hospitalar ()

Relacionado ao procedimento invasivo? Qual? (se hospitalar e se relacionado ao procedimento invasivo - sonda vesical, cateter, traqueostomia, diálise, alimentação parenteral, cirurgia) _____

Cirurgia? Qual? _____

Existe infecção em outra topografia? Qual? _____

Fez uso nos últimos dez dias de antibióticos? Quais? (descrever os motivos do uso) _____

Existe comprometimento imunológico? Sim () Não ()
(prematuridade, transplante de órgãos, uso de imunossupressores, diabetes, câncer, aids, leucemia, anemia falciforme, talassemia, hemofilia, esplenectomia, cirrose, etc.; doença oportunista? Qual?)

É paciente transferido ou de alta de outro hospital nos últimos 30 dias? Sim () Não ()

É portador, colonizado ou infectado de bactérias multirresistentes? Sim () Não ()

Para urocultura informar: sintomático () assintomático ()

Data do pedido ____/____/____

Nome legível do médico/CRM, carimbo e/ou telefone de contato (facilita a comunicação para situações emergenciais. Por exemplo, isolamento de *M. tuberculosis*, isolamento de nova cepa multirresistente, etc)

Data ____/____/____ **hora da coleta** _____

Nome e identificação de quem colheu o material (permite reavaliação de procedimentos e reciclagem, por exemplo, quando se detecta excesso de contaminação em uroculturas, etc) _____

Observações (comentários, quando necessários, sobre o procedimento de coleta. Por exemplo, acidentes ou dificuldades para obtenção do material, condições do paciente, quantidade, etc) _____

MODELO 3

Hemocultura:	Sangue periférico ()	Sangue colhido de cateter ()	
Urocultura:	Jato médio () Punção suprapúbica ()	Sonda de alívio () Saco coletor ()	Sonda vesical de demora ()
Trato Respiratório:	Orofaringe () Lavado bronco-alveolar () Outros ()	Escarro ()	Aspirado Traqueal () Escovado brônquico ()
Lesões, secreções, abscessos ()			
Descrever topografia: _____			
Nível da coleta:	superficial ()	profunda ()	
Via de obtenção do material:	Punção () Drenagem ()	Swab () Fístula ()	Raspado () Outros () _____
Líquidos cavitários:	Líquor () Sinovial ()	Líquido pleural () Ascítico ()	Pericárdico ()
Próteses ()	Pontas de cateter ()		
Outros: _____			

MODELO 4

Exame microscópico:	A fresco () Campo escuro () Direto ()
Com coloração:	Gram () Ziehl () Giemsa () Outro ()
Pesquisa de:	<i>Pneumocistis carinii</i> () <i>Cryptosporidium</i> () <i>Isospora belli</i> ()
Cultura:	Rotina bacteriológica () Rotina para fungos () Rotina para micobactérias () Rotina para vírus ()
Específicos:	Rotina para anaeróbios () Mycoplasma () <i>Legionella</i> spp. () <i>Helicobacter</i> spp. ()
Outros testes: (em geral realizados sob consulta) _____	

EXAMES ESPECIAIS DE INTERESSE DA CCIH

- Controle de medicamentos
- Frascos de soros
- Bolsas de sangue
- Portadores
- Equipamentos
- Outros

TESTES ESPECIAIS

- Aglutinação com látex para meningite.
- Testes imunológicos diretamente no material clínico: *Chlamydia trachomatis* (genital), *Streptococcus pyogenes* (orofaringe).
- Pesquisa de toxinas (*S. aureus*, *Limulus* teste para endotoxinas de Gram (-) *Clostridium difficile* etc.)
- Tipagem para fins epidemiológicos em investigação de surtos ou fontes de infecção hospitalar.
- PCR (polimerase chain reaction) para micobactérias, etc.
- Exames quantitativos (exceto os de rotina, como urina, cateter vascular e lavado broncoalveolar). Por exemplo, hemocultura de sangue periférico ou de cateter, biópsia de tecidos, líquido de diálise peritoneal, etc.

TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

- Rotina (Kirby – Baner).
- Antibiograma com drogas não padronizadas.
- Outros testes - Concentração Inibitória Mínima (CIM), E-test.
- Pesquisa de antimicrobianos no sangue, LCR, etc., poder bactericida do soro.
- Teste de sensibilidade de fungos a drogas, etc.

2. COLETA, TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRA

INTRODUÇÃO

Todo resultado liberado pelo laboratório de microbiologia é consequência da qualidade da amostra recebida. O material coletado deve ser representativo do processo infeccioso investigado, devendo ser eleito o melhor sítio da lesão, evitando contaminação com as áreas adjacentes.

A coleta e o transporte inadequados podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o desenvolvimento da flora contaminante, induzindo a um tratamento não apropriado. Portanto, procedimentos adequados de coleta devem ser adotados para evitar o isolamento de um "falso" agente etiológico, resultando numa orientação terapêutica inadequada.

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

Na amostra devem estar identificados:

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

ASPECTOS BÁSICOS DA COLETA E DO TRANSPORTE DE AMOSTRA

COLETA

Quem coleta o material deve ser devidamente treinado e periodicamente reciclado nesta atividade. Deve saber que o material deverá ser destinado, o mais brevemente possível, ao laboratório. Deve conhecer ou obter instruções sobre conservação e/ou transporte do material caso este não possa ser realizado imediatamente.

Considerações gerais da coleta microbiológica

- Colher antes da antibioticoterapia, sempre que possível.
- Instruir claramente o paciente sobre o procedimento.
- Observar a anti-sepsia na coleta de todos os materiais clínicos.
- Colher do local onde o microrganismo suspeito tenha maior probabilidade de ser isolado.
- Considerar o estágio da doença na escolha do material. Patógenos entéricos causadores de diarreia, estão presentes em maior quantidade e são mais facilmente isolados durante a fase aguda ou diarreica do processo infeccioso intestinal. Na suspeita de febre tifóide, a fase da doença irá determinar o melhor local da coleta (sangue/fezes).
- Quantidade suficiente de material deve ser coletado para permitir uma completa análise microbiológica. Caso a quantidade seja pequena, priorizar os exames.
- pedido do exame deve conter as informações descritas no módulo anterior (ver requisição de exame).

Considerações de segurança

- Utilizar as barreiras de proteção necessárias a cada procedimento.
- Toda amostra deve ser tratada como potencialmente patogênica.
- Usar frascos e meios de transporte apropriados.
- Não manusear a amostra em trânsito: paciente e laboratório.

- Não contaminar a superfície externa do frasco de coleta e verificar se ele está firmemente vedado. **(caso ocorram respingos ou contaminação na parte externa do frasco, fazer descontaminação com álcool 70% ou outra solução descontaminante disponível)**
- Não contaminar a requisição médica que acompanha o material.
- As amostras deverão ser transportadas em sacos plásticos fechados.
- Identificar claramente a amostra coletada, com todos os dados necessários.
- Colocar a identificação no frasco de coleta e nunca na tampa ou sobre rótulos.
- Encaminhar os materiais imediatamente ao laboratório.

TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Transportar as amostras **IMEDIATAMENTE** ao laboratório para:

- Assegurar a sobrevivência e isolamento do microrganismo, pois o laboratório de microbiologia trabalha basicamente em função da viabilidade dos microrganismos.
- Evitar o contato prolongado dos microrganismos com anestésicos utilizados durante a coleta, pois eles poderão exercer atividade bactericida.
- Evitar erros de interpretação nas culturas quantitativas, principalmente urina e lavado broncoalveolar.
- Consultar o laboratório para verificar a disponibilidade dos meios de transporte.

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

Amostra	Tempo Crítico	Frascos e Meios de Transporte
Liquor	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril
Líquido pleural	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril
Swab	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril ou meio semi-solido (Stuart, Amies)
Suspeita de anaeróbios	30 minutos	Meio de transporte apropriado Evitar o transporte em seringa com agulha
Feridas e tecidos	30 minutos de ou até 12 horas (meio de transporte)	Meio de transporte apropriado
Hemocultura	30 minutos (não refrigerar)	Frascos com meios de cultura para rotina manual ou automatizada
Trato respiratório	30 minutos	Tubo seco estéril
Trato gastrointestinal	1 hora	Tubo seco estéril
Urina	1 hora ou refrigerada até 24 horas	Pote seco estéril
Fezes	12 horas se em meio de transporte	Cary Blair meio modificado para transporte de fezes, com pH 8,4. Boa recuperação também para <i>Vibrio sp</i> e <i>Campylobacter sp</i>

CRITÉRIOS DE REJEIÇÃO PARA AMOSTRAS CLÍNICAS

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

O microbiologista ou responsável pela rotina deverá verificar se a amostra está apropriadamente identificada, se a quantidade de material é suficiente e observar o aspecto da amostra - purulento, límpido, hemorrágico, etc.

Principais erros de identificação

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

Amostras Inadequadas

- Material clínico recebido em solução de fixação (formalina).
- Ponta de cateter de Foley.
- Material conservado inadequadamente com relação a temperatura (urinas colhidas há mais de 24 horas, que ficaram guardadas em geladeira, ou colhidas há mais de duas horas, sem refrigeração).
- Frascos não estéreis.
- Presença de vazamentos, frascos quebrados ou sem tampa, com contaminação na superfície externa.
- Mais de uma amostra de urina, fezes, escarro, ferida colhida no mesmo dia e da mesma origem.
- Swab único com múltiplas requisições de testes microbiológicos.
- Swab seco.
- Culturas para anaeróbios recebidas em condições não apropriadas.

Amostras com as características acima descritas são inadequadas e demandam um contato prévio com o médico solicitante para melhores esclarecimentos.

Amostras não recomendadas para o exame microbiológico por fornecerem resultados questionáveis

Amostra	Procedimento
Swab de amostra de queimadura	processar biópsia ou aspirado
Swab de úlcera de decúbito	processar biópsia ou aspirado
Swab de abscesso perirretal	processar biópsia ou aspirado
Swab de lesão de gangrena	processar biópsia ou aspirado
Swab de lesão periodontal	processar biópsia ou aspirado
Swab de úlcera varicosa	processar biópsia ou aspirado
Vômito	não processar
Material de colostomia	não processar
Ponta de cateter de Foley	não processar
Aspirado gástrico de recém-nascido	não processar

INSTRUÇÕES PARA HEMOCULTURAS

TÉCNICAS DE COLETA

- Colher antes da administração de antibióticos.
- Lavar as mãos e secá-las.
- Remover os selos da tampa dos frascos de hemocultura e fazer assepsia prévia nas tampas com álcool 70%.

- Garrotear o braço do paciente e selecionar uma veia adequada. Esta área não deverá mais ser tocada com os dedos. Fazer a anti-sepsia com álcool 70% de forma circular e de dentro para fora. Aplicar solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI 10%) também com movimentos circulares e de dentro para fora. Para ação adequada do iodo, deixar secar por um a dois minutos antes de efetuar a coleta.
- Coletar a quantidade de sangue e o número de amostras recomendados de acordo com as orientações descritas ou se discriminadas no pedido médico.
- Remover o iodo do braço do paciente com álcool 70% para evitar reação alérgica.
- Identificar cada frasco com todas as informações padronizadas e enviar ao laboratório juntamente com a solicitação médica devidamente preenchida.

Observações:

- Não é recomendada a técnica de coleta através de cateteres ou cânulas quando se podem utilizar punções venosas.
- Punções arteriais não trazem benefícios na recuperação dos microrganismos quando comparadas com punções venosas.
- Não se recomenda a troca de agulhas entre a punção de coleta e distribuição do sangue no frasco de hemocultura.
- Método de coleta do sangue e o volume coletado influenciam diretamente no sucesso de recuperação de microrganismos e uma interpretação adequada dos resultados.
- Cada instituição deverá ter suas normas de coleta particularizadas de acordo com o tipo de sistema utilizado (manual x automatizado) e do tipo de paciente.

Fatores que influenciam diretamente os resultados de hemoculturas:

Volume de sangue coletado por frasco:

O **volume** ideal corresponde a 10% do volume total do frasco de coleta. Quanto maior o **volume de sangue** inoculado no meio de cultura, por amostra, melhor recuperação do microrganismo, respeitando-se a proporção sangue/meio citada, pois o sangue em desproporção com o meio pode inibir o crescimento de microrganismos. Frascos que possibilitem uma coleta de até 10 ml são os mais indicados. Exemplo: frascos com 40 ml coletar de 4 ml a 5 ml de sangue. O anticoagulante recomendado é o SPS (Polianetolsulfonato sódico).

Método de anti-sepsia:

A execução de técnica de anti-sepsia para reduzir os riscos de contaminação de hemocultura.

IDENTIFICAÇÃO DOS FRASCOS E PEDIDO MÉDICO

- Nome do paciente
- Hora e local da coleta
- Anotar uso de antibióticos
- Possível diagnóstico

TRANSPORTE

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

NÚMERO DE FRASCOS

- Deverá ser considerado de acordo com a condição clínica do paciente.
- Um total de três culturas em 24 horas costuma ser suficiente para descartar bacteremia ou endocardite (Coletas acima de quatro amostras não trouxeram maior índice de recuperação microbiana em diferentes trabalhos clínicos).
- Dados recentes sugerem que o número de frascos anaeróbios coletados deve ser adaptado de acordo com a patologia.

Adultos e Adolescentes

- Endocardite bacteriana aguda: coletar três amostras de punções venosas diferentes (braço direito e esquerdo), com intervalo de 15 a 30 minutos, 1 a 2 horas antes da antibioticoterapia
- Endocardite bacteriana subaguda: coletar três amostras, nas primeiras 24 horas, com intervalo mínimo de 15 minutos, com punções venosas diferentes. Colher, de preferência, as duas primeiras antes do início da febre. Se, após 24 horas de cultivo, não apresentarem crescimento bacteriano, colher mais três amostras.
- Infecções sistêmicas e localizadas como sepsis aguda, meningite, osteomielite, artrite ou pneumonia bacteriana aguda: coletar duas amostras de punções venosas diferentes, antes da antibioticoterapia, com intervalos de cinco minutos entre as punções. Se possível, 10 ml a 20 ml por amostra.
- Bacteremia de origem indeterminada: coletar quatro a seis amostras de punções venosas diferentes em 48 horas. Se, após 24 horas de cultivo, não apresentarem crescimento bacteriano, colher mais duas amostras.
- Paciente com picos febris regulares: coletar não mais que três amostras antes do início da febre (1 hora); evitar o pico febril.

Crianças

- Coletar amostras com 0,5 ml a 3 ml.
- Duas culturas são recomendadas para diagnóstico de bacteremias em recém-nascidos.

INSTRUÇÕES PARA PONTA DE CATETER INTRAVASCULAR

Cateteres intravenosos são importantes fontes de bacteremia e fungemia, bem como causadores de complicações infecciosas no local da inserção. Quando existe suspeita de colonização no cateter, com a possibilidade de evolução para septicemia, a ponta do cateter deve ser cultivada.

TÉCNICAS DE RETIRADA DA PONTA DE CATETER

Cultura semi-quantitativa (Método de Maki) da ponta de cateter é importante para determinar a relação entre colonização do cateter e sepsis. O resultado obtido, entretanto, depende de técnicas de retirada adequadas. **Deve ser salientado que os mesmos cuidados de desinfecção utilizados na introdução do cateter devem ser adotados no momento da retirada.** São eles:

- Fazer uma rigorosa anti-sepsia da pele ao redor do cateter com álcool 70%, seguida de uma solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI 10%, que deverá ser removida com álcool 70% para evitar queimadura pelo iodo ou reação alérgica).
- Remover o cateter e, assepticamente, cortar 5 cm da parte mais distal, ou seja, a que estava mais profundamente introduzida na pele. Não usar tesouras embebidas em soluções anti-sépticas.
- Colocar o pedaço do cateter num frasco estéril, sem meio de cultura. O material deve ser transportado imediatamente ao laboratório evitando sua excessiva secagem.
- A presença de um número maior ou igual a 15 colônias de um único tipo de bactéria sugere que a ponta de cateter pode estar sendo fonte de infecção.
- Cateteres aceitáveis para cultura semi-quantitativa: Central, CVP, Hickman, Broviac, periférico, arterial, umbilical, alimentação parenteral e Swan-Ganz.

INSTRUÇÕES PARA PONTA DE Sonda Vesical

Não realizar cultura de ponta de sonda vesical, porque o crescimento bacteriano representa a flora da uretra distal. Recomenda-se cultura de urina após 48 horas da retirada da sonda na monitorização de processos infecciosos.

Uroculturas realizadas antes deste período podem fornecer resultados positivos sem que eles estejam, necessariamente, associados à infecção.

INSTRUÇÕES PARA ESCARRO

Existem ocasiões em que o paciente deve participar ativamente da coleta de material, como no caso do escarro. A melhor coleta é feita sob a supervisão direta da equipe de enfermagem ou do fisioterapeuta.

Lembrar que este material não é considerado ideal para avaliação microbiológica do trato respiratório. Hemocultura, lavado brônquico ou aspirado transtraqueal podem fornecer resultados mais confiáveis.

- Orientar o paciente da importância da coleta do escarro e não da saliva. As amostras de saliva são impróprias para análise bacteriológica, pois não representam o processo infeccioso.
- Colher somente uma amostra por dia, se possível o primeiro escarro da manhã, antes da ingestão de alimentos.
- Orientar o paciente para escovar os dentes, somente com água (não utilizar pasta dental) e enxaguar a boca várias vezes, inclusive com gargarejos.
- Respirar fundo várias vezes e tossir profundamente, recolhendo a amostra em um frasco de boca larga. Se o material obtido for escasso, coletar a amostra depois de nebulização.
- Encaminhar imediatamente ao laboratório.
- Na suspeita de infecção por micobactérias ou fungos, coletar pelo menos três amostras, em dias consecutivos (somente uma amostra por dia).
- Em caso de pacientes com dificuldades para escarrar, esta amostra poderá ser induzida por inalação ou ser realizada coleta por aspiração transtraqueal.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO TRAQUEAL

A coleta deste material é realizada em pacientes entubados, através de sonda de aspiração. Os resultados microbiológicos dessas amostras podem refletir colonização local, sendo a interpretação clínica extremamente complicada.

Como procedimento para diagnóstico etiológico de pneumonias hospitalares, não se recomenda esse procedimento, que poderá levar a condutas terapêuticas inadequadas.

INSTRUÇÕES PARA ASPIRADO TRANSTRAQUIAL (ATT)

O procedimento é realizado por equipe médica especializada. O material é obtido diretamente por material transtraqueal, evitando-se contaminação com o trato respiratório alto.

INSTRUÇÕES PARA LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (BAL)

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

Os agentes etiológicos da pneumonia estão geralmente presentes em altas concentrações nas secreções pulmonares ($>10^5$ - 10^6 UFC/ml). O valor de corte sugerido para distinguir colonização de infecção é de 10^5 UFC/ml. Este valor foi determinado por alguns estudos, podendo ocorrer variações.

O tempo do transporte da amostra é essencial, devendo estar em torno de 30 minutos, sendo o máximo aceitável de 1 a 2 horas. O material deverá ser obtido antes das biópsias de escovados para se evitar excesso de sangue.

Este procedimento deve ser realizado por equipe médica especializada:

Colher as alíquotas em recipientes distintos:

- A primeira alíquota deverá ser colocada em frasco identificado como **primeira amostra** (utilizada para esfregaços microbiológicos).
- Todas as outras amostras poderão ser coletadas em um único frasco estéril (**POOL**). Somente estas amostras deverão ser utilizadas para a cultura quantitativa, evitando falsas contagens.

CULTURA PARA ANAERÓBIOS DO TRATO RESPIRATÓRIO:

Coletar tecido pulmonar, aspirado transtraqueal, aspirado percutâneo, aspirado transcutâneo e lavado brônquico via cateter protegido.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO DE OROFARINGE

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

As amostras devem ser cultivadas para recuperação do *Streptococcus pyogenes*.

- Solicitar ao paciente que abra bem a boca.
- Usando abaixador de língua e swab estéril, fazer esfregaços sobre as amígdalas e faringe posterior, evitando tocar na língua e na mucosa bucal.
- Procurar o material nas áreas com hiperemia próximas aos pontos de supuração ou remover o pus ou a placa, colhendo o material abaixo da mucosa.
- Coletar a amostra exatamente na área inflamada, evitando outros sítios na cavidade oral.
- Colher dois swabs.
- Enviar imediatamente ao laboratório para evitar a excessiva secagem do material.

INSTRUÇÕES PARA FLUIDOS ORGÂNICOS ESTÉREIS

(Líquidos: Pleural, Ascítico, Biliar, de Articulações e outros)

- Proceder a anti-sepsia no sítio da punção com álcool 70% e com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI 10%), que deverá ser removida após o procedimento, com álcool de 70% para evitar queimadura ou reação alérgica.
- Obter a amostra através de punção percutânea ou cirúrgica. Quanto maior o volume da amostra, maior a probabilidade de isolamento do agente etiológico. Coleta por procedimento médico.
- Encaminhar o líquido coletado em tubo seco e estéril ou inoculado diretamente nos frascos do equipamento de automação de hemoculturas.
- Transportar imediatamente ao laboratório, com a orientação do tipo de cultura (aeróbia, anaeróbia, fungos, micobactérias, etc.) necessariamente especificada no pedido médico.

LIQUOR

Procedimento realizado por equipe médica especializada.

- Recomenda-se jejum.
- Caso a coleta permita somente a disponibilidade de um tubo, o laboratório de microbiologia deverá ser o primeiro a manipulá-lo. Caso haja coleta de dois ou mais tubos, o Laboratório de Microbiologia deverá ficar com o tubo que contiver menos sangue.
- Ao transportar a amostra, nunca refrigerar.
- Transportar a amostra imediatamente ao laboratório, acompanhada de pedido médico adequadamente preenchido, nos casos de paciente com idade crítica.
- Os exames a serem realizados devem ser especificados e priorizados de acordo com o volume coletado.

INSTRUÇÕES PARA FERIDAS, ABSCESSOS E EXSUDATOS

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

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

Observações:

- A descontaminação da superfície das lesões ou abscessos abertos, antes da coleta do material, é crítica para interpretação do resultado.
- Não coletar o pus emergente. O material das margens da lesão e a parte mais profunda do sítio escolhido são mais representativos e possuem maior viabilidade de microrganismos.
- A cultura de lesões secas e crostas não é recomendada, a menos que a obtenção de exsudato não seja possível.
- A coleta de ferida de queimadura deve ser realizada após extensa limpeza e debridamento da lesão. Biópsia da pele é a técnica mais recomendada.

CULTURA PARA ANAERÓBIOS DE SECREÇÕES DE FERIDAS E ABSCESSOS

Aspirar o material com agulha e seringa após descontaminação da superfície com PVPI a 10%, deixando em contato com a superfície por um minuto. Quando o uso de agulha for contra-indicado, aspirar o material com cateter plástico flexível ou diretamente com seringa, sem agulha.

INSTRUÇÕES PARA AMOSTRAS DE TECIDO SUBCUTÂNEO E AMOSTRAS DE PELE

A superfície da ferida de queimadura estará colonizada pela microbiota do próprio paciente e/ ou pelos microrganismos do meio ambiente em que se encontra. Quando a colonização de bactérias for grande, pode ocorrer infecção subcutânea, resultando numa bacteremia. Cultura somente da superfície pode levar a erros e é desaconselhável. Portanto, biópsia de tecido profundo é o mais indicado.

Os microrganismos não ficam distribuídos somente na ferida queimada. Por isso, recomenda-se coletar amostras de áreas adjacentes da queimadura.

- Desinfetar a superfície com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI a 10%), que deverá ser removida com álcool 70% para evitar queimadura e reação alérgica. No caso de pacientes queimados usar solução aquosa de PVPI a 10% e ou solução fisiológica.
- Deixar secar antes de coletar a amostra.
- Coletar amostra de punção de biópsia (3 mm a 4 mm) para cultura.

CONSIDERAÇÕES PARA COLETA DE TECIDO SUBCUTÂNEO E AMOSTRAS DE TECIDO

Cultura	Procedimento
Bactéria	Aspirado ou amostra de biópsia são preferíveis ao invés de swab
Anaeróbio	Não é comum para queimaduras, úlceras, nódulos ou infecções superficiais da pele; usado para mordeduras e traumas

Fungo	Usada para diagnosticar dermatófitos, leveduras, filamentos e fungos dimórficos
Micobactéria	Útil no diagnóstico de <i>M. marimum</i> , <i>M. fortuitum</i> e <i>M. chelonei</i>

INSTRUÇÕES PARA BIÓPSIA DA PELE

- Descontaminar a superfície com solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2 % ou PVPI a 10%), que deverá ser removida com solução fisiológica para evitar queimadura e reação alérgica.
- Procedimento médico, coletar 3 mm a 4 mm de amostra.
- Colocar num recipiente estéril, sem formalina, com meio de cultura líquido fornecido pelo laboratório.

INSTRUÇÕES PARA TECIDO ÓSSEO

- Obter amostra óssea através de biópsia ou curetagem.
- Colocar num recipiente estéril contendo NaCl 0,85% estéril (solução fisiológica).
- Não usar formalina.

INSTRUÇÕES PARA LESÕES SUPERFICIAIS - coleta para fungos - micológico direto

- Limpar a superfície com água destilada ou soro fisiológico estéreis; não utilizar iodo.
- Usando um bisturi, raspar as bordas da lesão.
- Amostra do couro cabeludo inclui cabelo, que é seletivamente coletado para exame.
- Amostra de unha - obter raspado e/ou material abaixo da unha.

Os materiais obtidos podem ser colocados em placa de Petri estéril e identificados separadamente para cada sítio a ser investigado (por exemplo, unha da mão direita, raspado do pé esquerdo, raspado da região plantar, etc.).

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO DE OUVIDO

CONDUTO AUDITIVO EXTERNO E MÉDIO (ATÉ A MEMBRANA TIMPÂNICA).

- Remover secreção superficial com um swab umedecido em salina estéril e com outro swab obter material fazendo rotação no canal.
- Inserir, em seguida, no meio de transporte (Stuart).

CONDUTO AUDITIVO INTERNO

- Membrana timpânica rompida: o médico deve proceder como no item anterior e com espéculo ou cone de otoscópio coletar material com swab e em seguida inserir no meio de transporte. Com outro swab, fazer esfregaço para coloração Gram.
- Membrana íntegra: usar seringa para puncionar a membrana ou sistema apropriado para aspiração e coletor, que deverão ser encaminhados imediatamente ao laboratório para processamento ou introduzir em meio de transporte para conservação e fazer lâmina para bacterioscopia.

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO OCULAR

- As culturas deverão ser coletadas antes da aplicação de antibióticos, soluções, colírios ou outros medicamentos.
- Desprezar a secreção purulenta superficial e, com swab colher o material da parte interna da pálpebra inferior.
- Identificar corretamente a amostra e enviar imediatamente ao laboratório, evitando a excessiva secagem do material.

INSTRUÇÕES PARA MATERIAL GENITAL

AMOSTRAS E SÍTIOS GENITAIS PARA CULTURA

	Não indicados para o Cultivo de Anaeróbios	Indicados para o Cultivo de Anaeróbios
TRATO FEMININO	Endocérnix Vagina Uretra Placenta Vulva externo feminino Genital Períneo	Placenta (origem de cesárea) Endométrio Falópio de Trompa Aspirado cervical Ovário Glândulas de Bartholin
TRATO MASCULINO	Uretra Fluido prostático Fluido Seminal	

Observações:

- A seleção de materiais genitais, bem como sua coleta adequada, são fatores importantes na interpretação das culturas deste tipo de material, uma vez que estes possuem uma quantidade grande de microrganismos comensais.
- Culturas vaginais de rotina não são indicadas pelo motivo acima exposto.
- Culturas anaeróbias são limitadas a certos materiais, conforme tabela anterior.
- Muitos agentes de infecção genital em mulheres são limitados a certos sítios anatômicos, conforme tabela a seguir.
- Nos casos de suspeita de infecção por *Chlamydia trachomatis* deverá ser solicitado exame por imunofluorescência ou por biologia molecular (PCR). Pode ocorrer associação entre infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.
- Material purulento, proveniente da glândula de Bartholin, poderá ser obtido diretamente do ducto, após massagem digital ou colhida através de seringa.
- Endométrio: este tipo de material é melhor coletado por curetagem. Recomenda-se o uso de swabs protegidos para coleta via cérvix, para evitar contaminação com a flora vaginal.
- DIP (Doença Inflamatória Pélvica): o material é coletado por técnica invasiva. O líquido peritoneal pode ser coletado por aspiração do fundo de saco vaginal (culdocentese). Material retirado diretamente dos ovários ou trompas é coletado cirurgicamente.
- Vulva: raspados, aspirados ou biópsia não têm muito valor para cultura a não ser em casos de suspeita de sífilis. Nos casos de suspeita de sífilis, a lesão deverá sofrer uma 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.
- DIU (Dispositivo Intra-Uterino): deve ser removido pelo médico evitando-se contaminação cervical ou vaginal. Coloque todo o DIU dentro de um recipiente estéril para ser transportado para o laboratório.
- Cultura semi-quantitativa para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* podem ser realizadas com kits comercializados. Consultar a bula para maiores informações. Infecções por *Chlamydia trachomatis*: não aceitar secreção vaginal para pesquisa de *Chlamydia*, uma vez que este microrganismo não pode crescer nas células epiteliais escamosas da vagina *Chlamydia* são

parasitas intracelulares obrigatórios do epitélio colunar do cérvix. Realizar coleta de material endocervical, raspando-se o endocérvix para obter células e secreção. O swab deverá ser inoculado imediatamente em meio de transporte especial ou preparar as lâminas para coloração especial.

- Detecção de estreptococos do grupo "B" em mulheres: culturas cervicais não são aceitáveis e não se devem utilizar espéculos. Sugere-se coleta com swab do intróito vaginal e outro do orifício anorretal. Os swabs devem ser colocados em meios de transporte.
- Secreção prostática: poderá ser coletada após massagem digital pelo reto, podendo ser acompanhada de amostras de urina pré e pós-massagem. O material ejaculado também poderá ser submetido à análise.
- Na suspeita de *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres, a cultura é o método de escolha, sendo o material coletado do endocérvix. O encaminhamento deve ser feito em meio de transporte ou plaqueado imediatamente.

SECREÇÃO CERVICAL E VAGINAL

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

Preparo da paciente

Recomenda-se:

- Não estar menstruada
- Evitar ducha e cremes vaginais na véspera da coleta
- Três dias de abstinência sexual

Coleta Vaginal

- Inserir um espéculo (sem lubrificante; usar água morna) na vagina.
- Retirar o excesso de muco cervical com swab de algodão.
- Inserir os swabs indicados, rodar por alguns segundos sobre o fundo do saco, retirar e voltar aos meios indicados no *kit*:
 - Swab seco: realizar as lâminas para bacterioscopia da secreção fresca.
 - Swab do meio de transporte para cultura aeróbia/fungos.

Coleta endocervical

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

Cultura para anaeróbios do trato genital feminino

- Descontaminar o canal cervical com swab embebido de PVPI aquoso a 10%.
- Coletar amostra do trato genital superior de forma a obter material celular da parede uterina.

Amostras coletadas por laparoscopia, culdocenteses ou cirurgia, também são apropriadas para cultura de anaeróbios.

Cultura de dispositivo intra-uterino (DIU) tem valor estratégico para cultivo anaeróbio de *Actinomyces sp.*

SECREÇÃO URETRAL

A rapidez na entrega da amostra ao laboratório depende do sucesso da cultura.

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

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

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

INSTRUÇÕES PARA SECREÇÃO ANAL

- Inserir o swab cerca de 1 cm do canal anal e fazer movimentos de lado a lado para coletar material das criptas anais.
- Colocar a amostra em meio de transporte e enviar o swab imediatamente ao laboratório.

CONSIDERAÇÕES PARA COLETA DE SECREÇÕES DO TRATO ANO-GENITAL

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

INSTRUÇÕES PARA FEZES

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

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

SWAB RETAL

- Usar swab de algodão, certificando-se de que a ponta da haste que suporta o algodão está bem revestida.
- Umedecer o swab em salina estéril (não usar gel lubrificante) e inserir no esfíncter retal, fazendo movimentos rotatórios.
- Ao retirar, certifique-se que existe coloração fecal no algodão. O número de swabs depende das investigações solicitadas.
- Identificar a amostra e enviar ao laboratório no intervalo de 30 minutos ou utilizar o meio de transporte fornecido.

INSTRUÇÕES PARA URINA

A coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de duas a três horas.

CRIANÇAS

Assepsia rigorosa prévia dos genitais com água e sabão neutro, e posterior secagem com gaze estéril.

Modo de coleta:

O Ideal é jato intermediário (jato médio) espontâneo. Bem indicado em crianças que urinam sob comando, usado também em lactentes. Em lactentes em que não se consegue coletar através do jato médio, pode-se usar o saco coletor de urina, porém a troca deve ser realizada de 30 em 30 minutos e, ao trocar o coletor, refazer a assepsia. Em casos especiais (RN, lactentes de baixo peso, resultados repetidamente duvidosos) indicar punção vesical suprapúbica, que deverá ser realizada por médico.

ADULTOS SEXO FEMININO

A coleta de amostras do sexo feminino deve ser supervisionada pessoalmente por uma enfermeira ou auxiliar treinada. O processamento laboratorial deve ser feito dentro de duas horas. Caso não seja possível, as amostras deverão ser refrigeradas a 4°C até o momento da semeadura (no máximo de 24 horas).

- Remover toda a roupa da cintura para baixo e sentar no vaso sanitário.
- Separar as pernas tanto quanto for possível.
- Afastar os grandes lábios com uma das mãos e continuar assim enquanto fizer a higiene e coleta do material.
- Usar uma gaze embebida em sabão neutro, lavar de frente para trás e certificar-se que está limpando por entre as dobras da pele, o melhor possível.
- Enxaguar com uma gaze umedecida, sempre no sentido de frente para trás.
- Continuar afastando os grandes lábios para urinar. O primeiro jato de urina deve ser desprezado no vaso sanitário. Colher o jato médio urinário no frasco fornecido pela enfermagem (um pouco mais da metade do frasco). Evite encher o frasco.

- Fechar bem o frasco e caso haja algum respingo na parte externa do frasco, lave-o e enxugue-o.

ADULTOS SEXO MASCULINO

A coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de duas a três horas.

Pacientes cateterizados com sistema de drenagem fechada:

- Colher a urina puncionando-se o cateter na proximidade da junção com o tubo de drenagem.
- Não colher a urina da bolsa coletora.
- No pedido laboratorial deverá constar que o paciente está cateterizado.

Observação:

Não aceitar, sem exceção, as coletas de 24 horas dos materiais clínicos para cultura, particularmente de urina para o isolamento de micobactérias, devido a possível contaminação do material.

INSTRUÇÕES PARA ANAERÓBIOS

Anaeróbios podem estar envolvidos em infecções nas mais diversas partes do organismo humano. A coleta deve ser feita evitando-se contaminação com a flora normal endógena. Na solicitação médica deve constar também cultura para germes aeróbios. A boa comunicação entre o corpo clínico e o laboratório com o fornecimento de informações como impressão clínica, estado do paciente ou suspeita de organismo incomum assegura o sucesso da cultura anaeróbia.

Sempre que possível, mediante uma solicitação de cultura para anaeróbios, a amostra deve ser coletada através de aspirado com agulha e seringa ou através de fragmentos do tecido infectado.

A coleta com swab é a **menos recomendada** pelas seguintes razões:

- Material pode ser facilmente contaminado com organismos presentes na pele ou na superfície mucosa.
- Os anaeróbios ficarão expostos ao oxigênio ambiente.
- Material está sujeito à secagem excessiva.
- A quantidade de material encaminhada é relativamente pequena.
- São menos satisfatórios que os aspirados para preparação de esfregaços utilizados na análise microscópica, assim como para exame direto macroscópico (grânulos de enxofre - típico em actinomicose).

O uso de swab com meio de transporte específico deverá ser utilizado como última opção.

AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CULTURA DE ANAERÓBIOS

Sítio	Amostra Aceitável	Amostra Inaceitável
CABEÇA E PESCOÇO	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado do abscesso coletado com agulha e seringa após descontaminação da superfície - Material de biópsia coletado por cirurgia - Swab obtido por cirurgia quando for impraticável a aspiração 	<ul style="list-style-type: none"> - Swab de orofaringe e nasofaringe - Swab gengival - Material superficial coletado com swab
PULMÃO	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado transtraqueal - Material obtido de punção pulmonar percutânea - Material de biópsia obtido cirurgicamente - Amostra broncoscópica obtida com cateter "double-lumen" evitando 	<ul style="list-style-type: none"> - Escarro expectorado - Escarro induzido - Aspirado endotraqueal Material broncoscópico não coletado adequadamente

	contaminação	
SNC	<ul style="list-style-type: none"> - Liquor - Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa - Material de biópsia obtido por cirurgia 	- Swab aeróbio
ABDÔMEN	<ul style="list-style-type: none"> - Fluido peritoneal obtido com agulha e seringa - Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa - Bile - Material de biópsia obtido por cirurgia 	- Swab aeróbio
TRATO URINÁRIO	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado suprapúbico 	- Urina Urina de cateter
TRATO GENITAL FEMININO	<ul style="list-style-type: none"> - Material de laparoscopia - Aspirado endometrial obtido por sucção ou curetagem após descontaminação - Material de biópsia obtido por cirurgia - DIU (Dispositivo intrauterino), somente para <i>Actinomyces</i> sp 	- Swab vaginal ou cervical
OSSOS E ARTICULAÇÕES	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado obtido com agulha e seringa - Material de biópsia obtido por cirurgia 	- Material de superfície coletado com Swab
TECIDOS MOLES	<ul style="list-style-type: none"> - Aspirado obtido com agulha e seringa - Material de biópsia obtido por cirurgia - Aspirado do trato sinusal obtido com cateter plástico - Aspirado profundo de ferida aberta obtido após descontaminação da pele 	<ul style="list-style-type: none"> - Material de superfície coletado da pele ou bordos da ferida - Material coletado com Swab
ESTÔMAGO E INTESTINO DELGADO	<ul style="list-style-type: none"> - Somente na Síndrome de Alça Cega ou Síndrome de Má Absorção 	
INTESTINO GROSSO	<ul style="list-style-type: none"> - Somente para cultura ou pesquisa de toxinas quando houver suspeita de <i>C. difficile</i> ou <i>C. botulinum</i> 	

TEMPO DE TRANSPORTE X VOLUME DE AMOSTRA E/OU MÉTODO COLETADO

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

3. MICROSCOPIA E COLORAÇÃO

DIRETO SEM COLORAÇÃO

SALINA

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

HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

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

EXAME EM CAMPO ESCURO

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

TINTA DA CHINA

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

COLORAÇÃO DE GRAM

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

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

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

UTILIZAÇÃO

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

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS *

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

* **Observação:** Os materiais citados acima são opcionais, dependendo da amostra clínica coletada e da rotina laboratorial.

ESFREGAÇOS

Os esfregaços devem ser preparados com um gradiente de espessura suficientemente denso para facilitar a visualização, mas, também, bastante esparsos para revelar as características do agrupamento. Utilizar, de preferência, lâminas limpas e novas (não oxidadas). Os melhores resultados serão obtidos se as mesmas permanecerem no álcool até o momento do uso.

Técnica para preparo do esfregaço:

- Identificar a lâmina de maneira segura.
- Rolar toda a superfície do swab sobre a lâmina para não destruir as células.
- Fixar rapidamente na chama.
- Quando material é escasso, demarcar a área do esfregaço.
- Proceder o método de coloração mais apropriado.

Material Clínico

Amostra coletada com swab	<ul style="list-style-type: none"> - Rodar o <i>swab</i> suavemente pela lâmina limpa, evitando a destruição dos elementos celulares e dos agrupamentos - Quando somente um <i>swab</i> for coletado, colocá-lo em um tubo estéril contendo uma pequena quantidade de salina estéril (0,4 ml) e agitar (vortex) - Comprimir o <i>swab</i> contra as paredes do tubo e utilizá-lo para fazer o esfregaço. O restante do material pode ser inoculado nos meios de cultura. - Observação: materiais clínicos coletados com <i>swab</i> são menos recomendados para cultura. Coletar, sempre que possível, dois <i>swabs</i>: um será utilizado para fazer o esfregaço e o outro para cultura.
Aspirados, exsudatos, etc.	<ul style="list-style-type: none"> - Materiais recebidos em seringas serão transferidos para um tubo estéril e agitados (vortex), quando necessário - Selecionar a porção mais purulenta ou mucosa com pipeta ou alça bacteriológica - Amostras muito espessas ou purulentas podem ser diluídas com uma gota de salina estéril e espalhadas sobre uma grande área da lâmina formando um esfregaço delgado
Escarro	<ul style="list-style-type: none"> - Com auxílio de alça bacteriológica ou um palito de madeira, "pescar" uma porção purulenta do escarro que seja representativa - Rolar esta porção na parede do frasco para separar do material salivar - Em seguida, colocar o material na extremidade de uma lâmina limpa confeccionando um esfregaço delgado - Quando a quantidade de saliva for grande e pequenas porções purulentas forem visíveis, transferir a amostra para uma placa de Petri para facilitar a retirada do material representativo
Liquor ou outros fluidos orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> - Alguns laboratórios utilizam a citocentrífuga (<i>cytopspin</i>) para concentrar os líquidos orgânicos e fazer os esfregaços. Este método tem sido utilizado para aumentar a sensibilidade da coloração de Gram, diminuir o tempo de centrifugação e agilizar o resultado. Materiais aparentemente límpidos devem ser previamente centrifugados a 2.000-5.000 rpm /15 minutos e o esfregaço feito a partir do sedimento - Após a centrifugação, remover o sobrenadante com uma pipeta estéril, deixando, aproximadamente, 0,5 ml de sedimento - Colocar uma gota do sedimento numa lâmina limpa, sem espalhar e deixar secar - Para aumentar a concentração do fluido a ser examinado, adicionar uma segunda gota na mesma área da lâmina, anteriormente utilizada
Urina jato médio	<ul style="list-style-type: none"> - Homogeneizar bem o material e utilizar uma gota da amostra, sem centrifugação
Biópsias ou fragmentos de tecido	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar o material em uma placa de Petri estéril - Triturar com auxílio de um bisturi - Preparar os esfregaços fazendo vários <i>imprints</i> numa lâmina limpa, de preferência, estéril

Cultura em caldo

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

Meio sólido

- Utilizar uma gota de salina estéril em uma lâmina limpa;
- Transferir uma pequena porção da colônia com alça bacteriológica;
- Misturar suavemente para obter um esfregaço levemente turvo e homogêneo.
- Observação: para evitar a formação de aerossóis, nunca misturar o material vigorosamente.

Fixação do Esfregaço

Calor

Todo o esfregaço, antes de ser submetido a coloração, deverá estar seco (exposto ao ar), sendo fixado com calor brando (50°C). A fixação excessiva e o superaquecimento irão distorcer a morfologia celular e a fixação insuficiente permitirá a saída do material durante o processo de coloração. Deixar a lâmina esfriar antes de iniciar a coloração.

Metanol ou Etanol

A fixação pelo metanol ou etanol também pode ser utilizada. Além de prevenir a lise das hemácias, evita que os esfregaços, principalmente os de urina, desprendam-se no momento da coloração. Deixar o esfregaço secar numa superfície plana; após, colocar uma a duas gotas de álcool (1min), drenando o excesso, sem lavar. Não aquecer a lâmina antes da coloração.

PREPARO DO REAGENTE PARA A COLORAÇÃO DE GRAM (MODIFICADO POR HUCKER)

Cristal-violeta - solução estoque:

Solução A -

Cristal-violeta	40 g
Álcool etílico a 95%	400 ml

Solução B -

Oxalato de amônio	16 g
Água destilada	1600 ml

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

Cristal-violeta - solução de uso:

Solução A	40 ml
Solução B	160 ml

- Misturar as duas soluções.
- Deixar em repouso e filtrar após 24 horas.

Lugol (mordente):

Iodo metálico	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300 ml

Validade: seis meses em temperatura ambiente

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

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

Descolorantes:

Álcool etílico a 95% – agente descolorante lento ou
Álcool etílico a 95% e acetona (v/v) – agente descolorante intermediário.
Exige maior habilidade por parte do operador para que não ocorra hiperdescoloração.

Validade: um ano armazenado em frasco de âmbar a temperatura ambiente.

Precauções: etanol e acetona são inflamáveis.

Contracorante:

Solução de reserva -

safranina	5 g
álcool etílico a 95%	500 ml

Solução de trabalho -

solução de reserva	10 ml
água reagente	90 ml

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

- Misturar suavemente até a dissolução.

COLORAÇÃO

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

COMO REPORTAR OS RESULTADOS

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

LEITURA DO GRAM

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

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

Sistema de Quantificação

Células e Polimorfonucleares (PMN)

Média em 10 campos (10X de aumento) Microrganismos

Média em 15 a 20 campos (100 X aumento)

Neg.	+	++	+++	+	++	+++	++++
Neg.	Raras	Pouca	Muitas	Raros	Poucos	Muitos	Numerosos
0	1-9	10-24	>>25	<<1	1-5	6-19	>>20

CAUSAS COMUNS DE ERRO

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

CONTROLE DE QUALIDADE

- Verificar diariamente a aparência dos reagentes. Se a solução de cristal-violeta precipitar, refiltre antes de usar. A evaporação pode afetar a eficácia dos reagentes. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam trocadas regularmente, dependendo da demanda.
- Diariamente e quando novos reagentes forem preparados, corar, juntamente com os esfregaços da rotina, lâminas controles. Esfregaços de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) são preparados e fixados. Resultados esperados:
 - bacilos Gram-negativos, coloração rósea.
 - cocos Gram-positivos, coloração violeta.
- Sistema de revisão dos resultados do Gram:
 - a revisão diária de lâminas de Gram, selecionadas pelo supervisor, pode ajudar a determinar a necessidade de treinamento e adicionar informações de relevância clínica.
 - comparar resultados da cultura com a leitura do Gram.
- Fazer manutenção preventiva e limpeza dos microscópios.

OUTRAS COLORAÇÕES

ALBERT LAYBORN (CORINEBACTÉRIAS)

Solução A

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

Solução B

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

Execução

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

COLORAÇÃO DE FLAGELOS -IMPREGNAÇÃO PELO MÉTODO DE RHODES

Mordente

Ácido tânico, solução aquosa a 10%	10ml
Alúmen de potássio (solução aquosa saturada)	5ml
Óleo de anilina, solução saturada	1ml

- Dissolver, por agitação, o precipitado que se forma.
- Completar com cloreto férrico, solução 5%, 1ml.

Nitrato de prata amoniacal

- Dissolver 5g em 10ml de água destilada.
- Separar 5ml e, ao restante, acrescentar, gota a gota, solução concentrada de amônio, agitando sempre até formar-se um precipitado castanho que volta a se dissolver.
- Juntar gota a gota a solução inicial de nitrato de prata que se havia separado, até surgir leve turvação que persiste com a agitação.

Execução

- Preparar esfregaço;
- Filtrar o mordente sobre o esfregaço e deixar três a cinco minutos;
- Lavar abundantemente com água;
- Cobrir com o nitrato de prata amoniacal e aquecer suavemente até a emissão de vapores, por três a cinco minutos.

Resultado

Células em castanho-escuro e os flagelos mais claros em fundo ligeiramente granuloso.

COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Solução de carbolfucsina

Fucsina básica	0,3 g
Álcool etílico a 95%	10 ml
Cristais de fenol derretidos	5 ml
Água destilada	95 ml

- Dissolver a fucsina básica no álcool e o fenol na água. Misturar as duas soluções.
- Deixar repousar por vários dias antes de usar.

Ácido-álcool

Álcool etílico	97 ml
Ácido clorídrico concentrado	3 ml

Coloração de fundo (azul-de-metileno)

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

Execução

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

4. SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA

MATERIAL CLÍNICO E OS RESPECTIVOS MEIOS DE CULTURA E MICROSCOPIA

Meios de cultura para semeadura dos principais materiais clínicos e indicação de exames microscópicos.

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

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

Cultura para fungos ou micobactérias

- Para fungos: Sabouraud e Mycosel, ver orientação específica para semeadura
- Para micobactérias: Lowenstein Jensen, materiais contaminados com flora devem ser previamente descontaminados (escarro, urina, lavado bronquio-alveolar, fezes)

Coprocultura

- Recomendava-se semear em caldo enriquecedor do tipo Selenito, Tetracionato, etc., que tem valor duvidoso, sendo atualmente indicado para pesquisa de portadores.

Escarro para tuberculose

- Deve ser conservado em geladeira ou tratado para descontaminação, antes de semear em Lowenstein Jensen.

Lavado brônquico

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

Líquido Céfal Raquidiano (LCR)

- Centrifugar por 10 minutos/ 2.000 rpm (rotações por minuto), quando purulento, semear sem centrifugar;
- Semear em Ágar Chocolate + Ágar Sangue + Caldo Tioglicolato.
- Quando solicitado, pesquisar *Criptococos*, usando coloração com Tinta da China.

Ponta de cateter

- Cinco cm da ponta do cateter deve ser rolada 5 vezes sobre a placa de Ágar Sangue, utilizando a técnica semi-quantitativa de Maki.
- Quando enviado pedaço maior de cateter pode-se injetar 1 ml de salina cultivando separadamente (lúmen); a superfície externa pode ser semeada pela técnica de Maki.

Hemoculturas positivas

- Semear em Ágar Chocolate e fazer bacterioscopia (Gram).
- Frascos para micobactérias, fazer bacterioscopia (Ziehl).

Urina

- Dever ser semeada com alça calibrada de 10 µL em Ágar CLED (Brolacin).
- Se houver pedido de bacterioscopia: colocar 10 µL da urina sobre uma lâmina nova e deixar secar, corar pelo Gram, e verificar a presença de bactérias.
- Para diagnóstico da tuberculose: deve ser guardada em geladeira ou descontaminada antes de semear.

Secreção vaginal, endocervical, uretral e urina

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

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

- Fragmentar o material com um gral e pistilo de porcelana ou vidro estéreis contendo 1-2 ml de salina estéril ou caldo BHI (Brain Heart Infusion) ou TSB (Trypticase Soy Broth);
- Semear os fragmentos ou a porção líquida, e guardar o restante do material na geladeira para eventual uso.

Estudos quantitativos são trabalhosos pois dependem de pesar o material sólido, triturá-lo, diluir em volume definido de caldo (BHI, TSB ou Tioglicolato), bem como semear volume definido (10 ou 100ml com pipeta calibrada, usando ponteira estéril). O cálculo para a contagem de colônias deve levar em conta o número de gramas de tecido usado e a diluição do caldo (UFC/grama de tecido).

Líquido de diálise

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

Casos especiais

- No caso de secreção prostática, em que o material é bastante escasso, e existe contaminação uretral, recomenda-se semear rapidamente após a coleta com alça calibrada de 10 ml, e o resultado deve-se relatar em UFC/ml (multiplicando o número de colônias significativas do mesmo agente por 100), como para uroculturas.

Para outros materiais escassos colhidos com swab em meio de transporte (material de vesículas, swab de córnea ou conjuntiva, uretral, etc.), pode-se semear diretamente o swab nos meios de cultura indicados, ou tentar obter uma concentração do material do swab colocando-o em tubo estéril com 0,5 ml de salina estéril. Em seguida, agitar no vortex (mixer), centrifugar e utilizar o sedimento como inóculo, ou fazer esfregaço para bacterioscopia.

Escolha de meios de cultura seletivos em relação ao agente

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

PROCEDIMENTOS PARA SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA

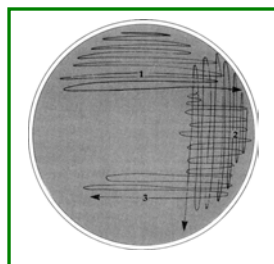
SEMEADURA QUALITATIVA

- Organizar as placas, pré-aquecidas em estufa (ideal para fastidiosos), ou à temperatura ambiente, sobre a bancada conforme o material a ser semeado.
- Identificá-las com o número da amostra e iniciais do paciente.

- Separar as lâminas correspondentes à cada exame, a serem preparadas e identificá-las.
- Homogenizar o material, quando líquido (urina, LCR, sangue, pleural, etc.).
- Escolher a porção mais purulenta no caso de secreções, ou no caso de fezes, a parte com sangue, muco ou pus.
- Os swabs deverão ser rolados sobre os meios de cultura, seguindo a sequência dos mais ricos para os mais seletivos (Ágar Chocolate, Ágar Sangue, Mac Conkey).
- Com material muito líquido (LCR, pleural não purulento) concentrar o material por centrifugação a 2.500 rpm (1500 g) por 10-15 minutos e semear o sedimento.
- Na semeadura de rotina pode-se utilizar placas com divisões de dois e três compartimentos para racionalização de gastos, mas seu uso exige maior habilidade na semeadura a fim de se obter colônias isoladas. Ex.:
 - hemocultura em placa 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, etc.

Técnica de Semeadura Qualitativa

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



- Descarregar o material num canto da placa;
- Flambar a alça;
- Esfriar a alça em um canto do ágar;
- Semear partindo da ponta da primeira semeadura.
- A cada mudança de direção flambar a alça e esfriá-la.

SEMEADURA QUANTITATIVA

Materiais indicados ou recomendados

- Urina
- BAL (lavado bronco alveolar)
- Aspirado traqueal
- Biópsia de tecido
- Líquido de diálise
- Secreção prostática
- Cateter (técnica de Maki e outras)

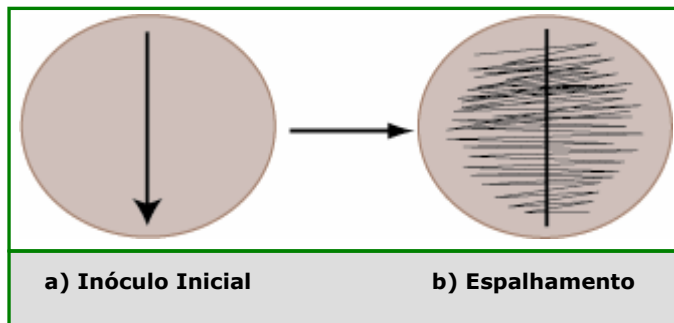
Técnica de Semeadura Quantitativa

O cultivo quantitativo baseia-se na semeadura de um volume conhecido de material e a contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônia) obtidas após incubação. Utilizam-se dois artifícios para o efeito de diluição do material:

- Uso de pequenos volumes: normalmente de 1, 10 ou 100 μ L. O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 ml, relativo ao volume inoculado; 1.000, 100 ou 10, respectivamente. Pode ser realizada utilizando-se volume de material definido por alça calibrada ou pipeta com ponteira estéril.
- Técnicas dilucionais: costuma-se utilizar a diluição seriada do material em escala decimal, isto é, 1:10, 1:100, 1:1.000 ... O número de UFC obtido deverá ser multiplicado pelo fator de correção para 1 ml, relativo à diluição utilizada; 10, 100, 1.000 ..., respectivamente.

Procedimentos gerais

- Homogeneizar o material com agitação manual em diferentes direções ou em vortex (mixer).
- Obter o volume definido pela técnica com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada. No caso da alça, observar a integridade da película formada até depositá-la na parte superior da placa. Ainda com a alça, sem flambar até o final da 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.



INCUBAÇÃO

A incubação deve seguir alguns parâmetros determinados.

Atmosfera

- Para bactérias não exigentes em secreções, urina, fezes, etc. incubar em estufa em atmosfera ambiente.
- Para bactérias exigentes tais como: pneumococos, hemófilos e Neisserias ou fastidiosos incubar em microaerofilia (Jarra com vela acesa de modo a obter 3-5% de CO_2).
- Para *Campylobacter* é necessário tensão de 5 a 10% de CO_2 e restrição de O_2 sendo conveniente o uso de geradores específicos.
- Para bactérias anaeróbias, incubar em sistema de anaerobiose estrita.

Temperatura

- $36^\circ C \pm 1^\circ C$ é a temperatura para a grande maioria das bactérias da rotina, incluindo os anaeróbios e micobactérias.
- Fungos podem ser cultivados a $30^\circ C$ ou 25 e $35^\circ C$.
- Temperatura à $42^\circ C$ pode ser necessário para isolar espécies de *Campylobacter*, *Acinetobacter aumannii*, e algumas espécies de *Pseudomonas*.

Umidade

- Bactérias fastidiosas e exigentes (neisserias patogênicas e hemófilos) crescem melhor se forem incubadas num recipiente com tensão de 5% de CO_2 com um chumaço de algodão embebido em água estéril.

Tempo

- Em geral a primeira leitura é realizada com 18 a 24 horas de incubação ou em casos de urgência para iniciar a identificação e antibiograma, a partir de 6 horas é possível visualizar crescimento de algumas enterobactérias.
- Para anaeróbios é recomendável a primeira leitura com 48 a 72 horas de incubação.

- Para bactérias exigentes ou de crescimento lento o período de incubação pode ser bastante prolongado: Micobactérias de 3 a 45 dias; *Nocardia*, 4 a 7 dias; *Brucella* 3 a 7 dias (hemoculturas até 45 dias).

Leitura

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

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DAS COLÔNIAS

Tamanho

O tamanho das colônias deverá ser considerado na placa como um todo, uma mesma cepa pode formar colônias de tamanhos variados em diferentes pontos da placa:

- Puntiforme (<1 mm de diâmetro) - colônias muito pequenas, características de bactérias mais exigentes.
- Pequena (até 2 mm de diâmetro) – *Shigella* e *Yersinia* costumam crescer em MaC Conkey e Salmonella-Shigella como colônias pequenas e lactose negativa. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp, *Enterococcus* spp, pneumococos, *Streptococcus* spp. *Cândida* spp e alguns esfafilococos coagulase negativo também costumam formar colônias pequenas.
- Média (até 3 mm de diâmetro) – Enterobactérias, não fermentadores e Estafilococos.
- Grandes (mais de 4 mm de diâmetro) – *Bacillus* spp, algumas enterobactérias como *Klebsiella* e *Enterobacter*, o mesmo ocorre com não fermentadores como *Pseudomonas*. Vale lembrar a formação de véu, característico do gênero *Proteus*, *Comamonas* e algumas cepas de *Pseudomonas*.

Cor

A coloração dependerá do meio de cultura utilizado.

Meios não diferenciais – pode-se identificar a coloração características de alguns microrganismos:

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

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

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

Hemólise

Baseada na lise de hemácias contidas no Ágar Sangue (5%)

- Lise total – denominada beta-hemólise, ocorre a formação de halo de transparência ao redor e/ou sob a colônia: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Listeria*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus*.
- Lise parcial – denominada alfa-hemólise, há formação de halo com coloração esverdeada: *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus*.
- Ausência de lise – definida como gama-hemólise, meio de cultura inalterado: *Enterococcus*, Estafilococos coagulase negativo.

Forma da colônia

- Redonda – *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, Estafilococos, Estreptococos
- Irregular – *Pseudomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Bacillus*

- Produção de véu – *Proteus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*
- Filamentosas – fungos filamentosos
- Formando pontas, como estrelas – *Cândida*
- Com depressão no centro – Pneumococo
- Cerebriforme – *Pseudomonas stutzeri*
- Elevada – *Klebsiella*, *Bacillus*
- Chata – *Enterobacter*, *Pseudomonas*

Consistência

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

Cheiro

- *Eikenella corrodens* – cheiro de cloro
- *Pseudomonas* – cheiro adocicado
- Anaeróbios – cheiro fétido

Densidade

- Opaca: *E. coli*, *Candida*, *S. aureus*
- Brilhante: *Stenotrophomonas*, Pneumococo

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E CONTAGEM

Cultura Quantitativa

- Avaliar a homogeneidade de crescimento pela placa
- Contar separadamente todas as colônias diferentes, até 300 UFC
- Para a contagem deve-se marcar com uma caneta o verso de cada unidade contada, para evitar que se conte duas vezes a mesma colônia
- Contagens maiores devem ser determinadas por estimativa
 - Dividir a placa em 4 ou 8 partes
 - Observar a homogeneidade do crescimento e contar as partes que sejam mais representativas do crescimento total
 - Contar o número de UFC da parte escolhida e multiplicar pelo total de partes
- Converter o número de UFC contadas em UFC/ml ou UFC/g, conforme o material analisado

Utilizar o fator de correção:

do volume:

- 1 µL – multiplicar por 1.000
- 10µL – multiplicar por 100
- 100µL – multiplicar por 10

e/ou diluição:

- diluição 1:10 – multiplicar por 10
- diluição 1:100 – multiplicar por 100
- diluição 1:1000 – multiplicar por 1000

Cultura Semi-quantitativa e Qualitativa

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

Para estes materiais o objetivo pode ser encontrar um patógeno específico entre bactérias da microbiota considerada normal na área de onde foi obtida a amostra clínica (*S. pyogenes* em orofaringe, *Salmonella* e *Shigella* em fezes, *N. gonorrhoeae* em secreção uretral, etc). Outras vezes deve-se relatar as bactérias potencialmente patogênicas e descrever a relação entre as colônias isoladas (predomínio de..., presença de... ou raras colônias de...) Ex: Cultura de ferida cirúrgica = predomínio de *S. aureus*, presença de *P. aeruginosa* e raras colônias de *E. coli*, e ignorar raras colônias de *Staphylococcus coagulase negativo*, ou de estreptococos alfa hemolíticos, corineformes, quando bactérias potencialmente patogênicas forem isoladas.

5. IDENTIFICAÇÃO

MEIOS DE CULTURA

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

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

COLORAÇÃO DE GRAM

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

GRAM POSITIVOS

Cocos	Cadeias longas - estreptococos aeróbios e anaeróbios
	Cachos – estafilococos e peptococos (anaeróbio).
Coco-bacilo (podem formar cadeias curtas)	Cachos e tétrades – <i>Micrococcus</i> , <i>Stomatococcus</i> , <i>Aerococcus</i> spp
	Aos pares – <i>Enterococcus</i>
	Gram variável – <i>Gardnerella</i>
	Em chama de vela – <i>S. pneumoniae</i>
	Retos e curtos – <i>Lactobacillus</i> , <i>Erisipelotrix</i> , <i>Listeria</i> , <i>Rhodococcus</i>

Bacilos	Ramificados – <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Propionibacterium</i> (anaeróbico)
	Difteróides – <i>Corynebacterium</i>
	Esporulados – <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>

GRAM NEGATIVOS

Cocos (visualizados aos pares)	<i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Branhamella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Veillonella</i> (anaeróbico)
Coco-bacilo	<i>Haemophilus</i> (pleomórfico, ora coco-bacilo, ora bacilo), <i>Brucella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Bacteróidesa</i> (anaeróbicos), Enterobactérias
Bacilos	Curvos – <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Vibrio</i>
	Helicoidais – <i>Arcobacter</i> e <i>Borrelia</i> . <i>Leptospira</i> e <i>Treponema</i> (não visíveis ao Gram)
Bacilos	Retos – Enterobactérias, não fermentadores
	Extremidades afiladas – <i>Fusobacterium</i> (anaeróbico)
	Extremidade bifurcada – <i>Bifidobacterium</i> (anaeróbico)

ESQUEMA GERAL DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

CRESCIMENTO BACTERIANO

- Observar as características das diferentes colônias crescidas em cada meio de cultura utilizado. Lembrar que o tamanho das colônias de um mesmo agente pode ser variável, conforme a proximidade com outras colônias.
- Por exemplo, semeadura em Ágar sangue (AS) e Mac Conkey (MC):
 - Observar quantos tipos de colônia cresceram em cada ágar.
 - As colônias que cresceram somente em AS devem ser de microrganismo Gram positivo ou mais exigente.
 - Todas as colônias presentes no MC, microrganismos Gram negativo, devem apresentar correspondente no AS.
- A escolha dos meios utilizados para cada material deve estar relacionada aos agentes esperados.

Crescimento dos microrganismos nos principais meios de cultura utilizados na rotina

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

+ Meio dá suporte ao crescimento

- Meio não dá suporte ao crescimento

* Principalmente em coluna alta

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

- Muitas vezes é impossível definir o significado clínico de um isolado sem conhecer sua identificação.
- Todo crescimento deve ser classificado como patógeno em potencial ou mero contaminante. Para tanto, deve-se reunir evidências microbiológicas, clínicas e epidemiológicas:
 - Conhecer os principais patógenos esperados para cada material biológico
 - Obter o máximo de informações sobre o quadro clínico apresentado
 - Os componentes da microbiota residente (*Micrococcus*, Estafilococos coagulase negativo, *S. viridans*...) apresentam menor valor preditivo positivo como agentes infecciosos, sendo de fácil interpretação na maioria dos casos. Entretanto, em condições específicas podem participar como agentes patogênicos. Por exemplo:
 - ✓ Duas ou mais hemoculturas periféricas com *S. viridans* podem ser consideradas como possível diagnóstico de bacteremia por este agente, devendo ser investigada a possibilidade de endocardite
 - Observar se a cultura é pura ou se existem diferentes tipo de colônias, neste caso, se há predomínio de um tipo.
 - As culturas puras apresentam maior valor preditivo positivo para diagnóstico, especialmente em sítios intensamente colonizados.
 - Por exemplo: cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Candida* em coprocultura. Entretanto, podem ocorrer também como contaminantes. Por exemplo: cultura pura de *S. viridans* em swab de orofaringe
 - Sempre que possível, deve-se traçar um paralelo entre os achados da bacterioscopia direta do material e o resultado da cultura, buscando:
 - ✓ Valorizar achados de cultura – bacterioscopia com predomínio de cocobacilos pleomórficos em BAL e isolamento de *Haemophilus* em cultura, ainda que em baixas contagens por dificuldades de crescimento
 - ✓ Definir contaminantes – presença de abundantes células epiteliais na bacterioscopia da urina não centrifugada ou em escarro, denotando a contaminação com a microbiota local
 - ✓ Detectar falhas nas condições de coleta e/ou processamento laboratorial e uso de antimicrobianos– Bacterioscopia de liquor, líquido articular ou secreção conjuntival com diplococos Gram negativo aos pares intracelulares e cultura negativa
 - ✓ Caracterização de infecção por anaeróbios – cultura negativa com bacterioscopia revelando microrganismos com características morfológicas de anaeróbios
 - ✓ Quantificação – em culturas quantitativas os achados da bacterioscopia direta devem coincidir com as contagens obtidas em cultura (urocultura, BAL, aspirado traqueal ...)

COLORAÇÃO DE GRAM DAS COLÔNIAS ISOLADAS

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

DIRECIONAMENTO DA IDENTIFICAÇÃO

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

6. MANUTENÇÃO E ESTOQUE DE CULTURAS

MANUNTENÇÃO DAS CULTURAS

PREPARO DE CULTURAS

Uma vez obtida uma cultura satisfatória, a mesma deve ser mantida pura e viável e para isso é preciso:

- transferir periodicamente a cultura em um meio de cultura adequado;
- incubar até que a cultura atinja a fase estacionária máxima de crescimento;
- e estocar em temperatura apropriada para impedir maior crescimento.

A cultura é preparada usualmente a partir de uma cultura anterior ou originalmente do estoque. Ao cultivar a cultura desejada procura-se obter uma cultura que contenha somente o microrganismo desejado, um número uniforme da população, que seja viável e que apresente resistência a condições desfavoráveis. O sucesso no preparo da cultura está também relacionado com o preparo e esterilização do meio de cultura, da inoculação e do tempo e temperatura de incubação.

A temperatura de incubação geralmente é próxima da temperatura ótima para aquela espécie. Tanto a temperatura quanto o tempo de incubação são freqüentemente ajustadas de modo que a cultura esteja pronta na hora em que ela for utilizada. Do contrário, a cultura deve ser esfriada para impedir um desenvolvimento superior ao desejado.

As culturas podem ser preservadas em tubos e então transferidas periodicamente para meios de preparo recente. Os intervalos de tempo em que são feitas as transferências variam de acordo com o microrganismo. Quando este procedimento é adotado na manutenção de uma coleção de culturas, considerar o meio próprio de cada espécie, a temperatura adequada de armazenamento e o tempo de transferência.

Observar que a transferência frequente de uma cultura instável pode levar a mudanças indesejáveis nas suas características.

PUREZA DAS CULTURAS

Para assegurar a pureza das culturas, estas devem ser obtidas periodicamente de uma cultura e verificadas regularmente quanto à pureza.

Os métodos para avaliar a pureza da cultura variam com o tipo de cultura a ser testada.

- Exame microscópico: a contaminação é indicada pela aparência e pelo número elevado dos mesmos.
- Semeadura em meio nutritivo: permite o crescimento de contaminantes.
- Testes bioquímicos: provas para presença de substâncias produzidas por contaminantes.

VIABILIDADE DA CULTURA

A viabilidade é avaliada pela taxa de crescimento e atividade metabólica. A deterioração das culturas pode resultar do manuseio incorreto, do cultivo inadequado, de transferências freqüentes por um longo período, meio de cultura impróprio, mutação e ataque da bactéria por um bacteriófago.

ESTOQUE DE CULTURAS

O estoque de culturas deve ser preparado de modo que as culturas sejam armazenadas e preservadas por um longo período sem transferência. Tais culturas tendem a permanecer estáveis e são utilizadas como fonte de cultura caso a cultura ativa seja perdida e/ou deteriorada.

As culturas podem ser estocadas pelos seguintes métodos:

- liofilização (freeze drying)
- refrigeração em $\leq - 50^{\circ}\text{C}$

- refrigeração em nitrogênio líquido (-196°C)
- vedação com parafina ou camada de óleo mineral em ágar inclinado

ESTOQUE DE CULTURAS BACTERIANAS POR ≥ 1 ANO

LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um método comum e reconhecido para preservação de microrganismo. É um método denominado também de “freeze-drying”, cujo processo implica na estabilização da cultura de modo a não mais permitir atividade biológica ou reações químicas. A cultura é primeiramente congelada e em seguida a umidade presente é reduzida por *sublimação* (primeira etapa de dessecação) e por *desorção* (segunda etapa de dessecação).

Para o processo de liofilização alguns fatores influenciam na recuperação e estabilidade da população do microrganismo. Estes fatores são os seguintes:

- Fase log, estacionária e lag de um microrganismo específico semeada em meio de cultura.
- Propriedades físico-químicas do meio de cultura.
- Temperatura da fase de congelamento do microrganismo.
- A taxa de liofilização e extensão da remoção da umidade.
- O estoque de microrganismo liofilizado com relação à temperatura e exposição à umidade.
- Composição físico-química do solvente e o período de hidratação.

Obter cepas comerciais e estocá-las conforme as instruções do fabricante.

CONSERVAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA E EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

A fácil disponibilidade de refrigeradores e de tanque de refrigeração com nitrogênio líquido proporciona um outro meio de estoque de culturas. Este tipo de conservação tem sido comprovadamente satisfatório e adotado também como uma alternativa para microrganismos que não podem ser mantidos liofilizados. Neste método, as células são congeladas junto com um agente protetor como glicerol.

Preparo do meio de conservação:

- Utilizar ágar sangue de carneiro, sangue de coelho ou caldo soja tripticaseína (soybean-casein digest) esterilizado contendo 15% de glicerol; o caldo soja tripticaseína pode ser estocado a 4°C até 6 meses.
- Adicionar o meio em tubos estéreis que serão utilizados para o estoque da cultura e identificá-los.

Inoculação:

- A partir de uma cultura semeada em meio apropriado, preparar uma densa suspensão de células e agitar bem.
- Preparar um número suficiente de tubos para estoque de cepas por um ano. Mantenha dois tubos como estoque permanente.
- Resfriar a - 50°C ou abaixo. À - 50°C, as cepas podem ser mantidas por um ano. Já à -70°C ou em líquido de nitrogênio, as culturas podem ser mantidas indefinidamente. Via de regra, deve-se substituir os não fastidiosos a cada 5 anos e os fastidiosos a cada 3 anos.

Recuperação das cepas estocadas:

- Retirar o tubo do refrigerador ou do tanque de refrigeração e descongelar em água morna.
- Semear em meio sólido e não refrigerar novamente o tubo utilizado.

Modo alternativo

- Retirar o tubo e obter com a alça uma porção congelada da suspensão bacteriana
- Semear em meio sólido e retornar o tubo ao refrigerador; as cepas devem ser semeadas duas vezes antes de serem utilizadas como controles.
- Verificar anualmente a viabilidade da cultura.

CONSERVAÇÃO COM ÓLEO MINERAL

Muitas bactérias podem ser conservadas cobrindo-se o crescimento em ágar inclinado com óleo mineral estéril. O óleo deve cobrir completamente o meio alcançando 1 cm acima da extremidade do bisel. A conservação nessas condições varia conforme a espécie, mas é geralmente possível por vários anos.

A recuperação da cepa se faz removendo com uma alça parte da cultura sob o óleo e semeando-a para um meio recente.

ESTOQUE DE CULTURAS BACTERIANAS POR < 1 ANO

MEIOS COMERCIAIS

- Ágar cistina-tripticase sem carboidrato para estafilococos, estreptococos e outros fastidiosos; adicionar 1 ml de soro de cavalo estéril no meio.
- Meio com carne cozida sem glicose para anaeróbios e anaeróbios facultativos; armazenar em temperatura ambiente.
- Ágar soja tripticaseína para fastidiosos
- Ágar sangue e ágar chocolate inclinado para estreptococos fastidiosos e *Haemophilus* spp; armazenar até duas semanas.

INOCLULAÇÃO

- Identificar os tubos.
- Inocular com uma cepa cultivada no respectivo meio.
- Incubar overnight, vedar e armazenar em temperatura ambiente ou 5°C.

RECUPERAÇÃO DAS CEPAS ESTOCADAS

- Retirar parte da cultura contida no tubo e semear em meio sólido.
- Incubar overnight.
- Preparar novos estoques o quanto necessário ou por 6 meses.

Alguns exemplos de exigências para a preservação de algumas espécies de bactérias.

Bactéria	Meio	Intervalo	Temperatura de incubação	Temperatura de estocagem
<i>Neisseria</i> spp.	Ágar cistina-tripticase	1 mês	35°C	35°C
<i>Bacillus</i> spp.	Ágar nutritivo	12 meses	28°C	10°C
<i>Pseudomonas</i> spp.	Ágar nutritivo	3 meses	28°C	10°C
<i>Clostridium</i> spp.	Meio com carne cozida	6 meses ou mais	28°C	ambiente
<i>Mycobacterium</i> spp.	Ágar glicerina	4 meses	30°C	10°C

ESTOQUE DE MICOBACTÉRIAS POR ≥ 1 ANO

CONSERVAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA

- Semear a micobactéria em caldo Middlebrook e colocar em tubos indentificados.
- Ou suspender a cultura em leite desnatado ou caldo brucella com 15% de glicerol.
- Para ambas alternativas, armazenar a -70°C.

- Para recuperação da cepa:
 - descongelar rapidamente em banho-maria a 37°C.
 - a suspensão estoque pode ser descongelada e novamente refrigerada várias vezes sem perda da viabilidade das células.

CONSERVAÇÃO A 4°C

- Semear a espécie em ágar inclinado à base de ovo.
- Armazenar a 4°C até 1 ano.

ESTOQUE DE MICOBACTÉRIAS POR < 6 MESES

- Semear a espécie em ágar inclinado à base de ovo.
- Armazenar em temperatura ambiente no escuro até 6 meses.

ESTOQUE DE CULTURA DE FUNGOS POR ≥ 1 ANO

CONSERVAÇÃO DA CULTURA EM ÁGUA

É o método mais simples e confiável:

- Adicionar 2 a 3 ml de água esterilizada sobre esporos viáveis semeados em ágar inclinado de batata dextrose.
- Suspende cuidadosamente no próprio tubo a conídia sem machucar o meio de cultura.
- Remover a suspensão e coloca-la em um tubo estéril.
- Fechar o tubo firmemente e identificá-lo adequadamente.
- Armazenar em temperatura ambiente; o microrganismo pode permanecer viável por vários anos.
- Para a recuperação da espécie:
 - agitar bem o tubo e inocular uma gota em ágar batata dextrose.

CONSERVAÇÃO COM ÓLEO MINERAL

- Cubrir completamente a cultura semeada em ágar inclinado de batata dextrose com óleo mineral estéril.
- Vedar o tubo firmemente e identificá-lo.
- Incubar em temperatura ambiente.
- Para a recuperação da cultura:
 - passar na chama o tubo;
 - obter parte do crescimento com a alça estéril;
 - escoar o óleo;
 - inocular em caldo Sabouraud ou ágar inclinado;
 - incubar 30°C até o obter o crescimento da cultura.

CONSERVAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA

- Congelar a -70°C esporos viáveis semeados em ágar inclinado de batata dextrose; o tubo deve ser de boa qualidade, senão o mesmo pode quebrar.
- Para a recuperação da cultura:
 - retirar do refrigerador;
 - Remover imediatamente parte do crescimento do ágar;
 - inocular em ágar batata dextrose;
 - retornar o tubo original (estoque) ao refrigerador; caso descongele, preparar uma nova cultura.

ESTOQUE DE CULTURA DE FUNGOS POR < 6 MESES

- Armazenar a 4°C cultura de esporos viáveis semeados em ágar batata dextrose até seis meses; os fastidiosos necessitam ser transferidos para meio de preparo recente mais freqüentemente.
- Atenção ao fato de que a transferência freqüente resulta em culturas atípicas e inativas.

COLEÇÕES DE CULTURA

Em todo mundo há organizações que mantêm culturas puras autênticas de microrganismos. Estas estão disponíveis para diversas finalidades e assim desempenham um papel fundamental para os microbiologistas tanto nos serviços prestados quanto nas pesquisas experimentais.

Para informações sobre coleções de cultura no mundo e os respectivos países registrados no WDCM (World Data Center for Microorganism), acessar – www.wdcm.nig.ac.jp/hpcc.html

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ballows, A.J., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. **Manual of clinical microbiology**, 5 th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
2. Baron, F.J., and Tenover, F.C. **Diagnostic Microbiology**, 8 th ed., CV Mosby, St. Louis, 1990.
3. Bartlett, J.G., Ruan, K.J., Smith, T.F. and Wilson, W.R. **Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections**. CUMITECH 7A, Coordinating ed., J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
4. Clarridge, J.E., Pezzlo, M.T. and Vosti, K.L. **Laboratory Diagnosis of urinary tract infections**. CUMITECH 2A, Coordinating ed., A.S. Weissfeld, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
5. Forbes, B.A. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 10th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1998.
6. Gilligan, P.H., Janda, J.M., Karmali, M.A and Miller, J.M. **Laboratory Diagnosis of Bacterial Diarrhea**. CUMITECH 12A, Coordinating ed., F.S. Nolte. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
7. Isenberg, H.D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
8. Isenberg, H.D. **Essential procedures for Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
9. Isenberg, H.D., Schoenknecht, F.D. and A. VON. G., **Collection and processing of bacteriological specimens**. CUMITECH 9, Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1979.
10. Koneman, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**, 5th ed., Lippincot, Philadelphia, 1997.
11. Miller, J.M. **A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1996.
12. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle da infecção hospitalar**. Brasília, 1991.
13. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, F.C. **Manual of Clinical Microbiology**, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
14. NCCLS. **Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals**, 2nd. Ed., Approved Guide-line. NCCLS document GP2-A2 (ISBN 1-56238-156-3) NCCLS, Villanova, 1992.
15. Reller, L.B., MURRAY, P.R. and Mac Lowry, J.D. **Blood Cultures II**. CUMITECH 1A, Coordinating ed., J.A. Washington II, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982.
16. Rodloff, A.C., Appelbaum, P.C. and Zabransky, R.F., **Practical Anaerobic Bacteriology**. CUMITECH 5A, Coordinating ed., A.C. Rodloff, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.