



Universidade de Aveiro

2020

**RUTE LÍLIA DE SOUSA
GONÇALVES**

**TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE
MICROORGANISMOS DA FASE
PRÉ-ANALÍTICA À FASE PÓS-ANALÍTICA**



**RUTE LÍLIA DE SOUSA
GONÇALVES**

**TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE
MICRORGANISMOS DA FASE
PRÉ-ANALÍTICA À FASE PÓS-ANALÍTICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
professora associada da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela de Oliveira Pereira
investigadora doutorada (nível 1) da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
professora auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

palavras-chave

fases de processamento, produto biológico, laboratório de análises clínicas.

resumo

Esta dissertação teve por objetivo descrever as diferentes fases de processamento de um produto biológico, desde a fase pré-analítica até à pós-analítica num laboratório de análises clínicas.

O estágio foi realizado no Laboratório José Manuel Chau, S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho no âmbito do Mestrado em Microbiologia da Universidade de Aveiro que decorreu entre setembro de 2019 e junho de 2020.

O relatório aborda os diferentes procedimentos laboratoriais, desde as instruções de colheita para os diferentes tipos de amostras, como é realizada a colheita, como é manipulada a amostra na sua chegada ao laboratório, as metodologias utilizadas, os equipamentos e a respetiva interpretação e validação dos resultados.

keywords

processing phases, biological product, clinical analysis laboratory.

abstract

This report aimed to describe the different stages of a biological product processing, from the pre-analytical to the post-analytical phase, in a clinical analysis laboratory.

The internship was held at José Manuel Chau, S.A. Laboratory, which belong to Beatriz Godinho Group under the Master's Degree in Microbiology at University of Aveiro, having taken place between September 2019 and June 2020.

The report addresses different laboratory procedures, from collection instructions to different types of samples, the way the collection is carried out and the sample is handled on arrival at the laboratory, methodologies used, equipment, as well as the respective interpretation and validation of results.

Índice

| | |
|--|----|
| Índice de tabelas | 8 |
| Índice de figuras | 10 |
| Lista de abreviaturas | 11 |
| Introdução | 12 |
| Fase pré-analítica | 14 |
| Instruções de colheita | 14 |
| 1. Colheita de urina para urocultura | 15 |
| 2. Colheita de fezes para exame parasitológico..... | 17 |
| 3. Colheita de fezes para coprocultura | 18 |
| 4. Colheita de esperma para espermocultura..... | 19 |
| 5. Colheita de expectoração para exame bacteriológico e micológico | 20 |
| 6. Colheita de sangue para hemocultura | 20 |
| 7. Colheita de exsudado vaginal..... | 21 |
| 8. Colheita de exsudado vaginal para pesquisa de <i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo B..... | 22 |
| 9. Colheita de exsudado uretral | 22 |
| 10. Colheita de exsudado purulento superficial | 23 |
| 11. Colheita de exsudado retal..... | 24 |
| 12. Colheita de exsudado faríngeo..... | 24 |
| 13. Colheita de exsudado auricular direito e esquerdo | 25 |
| 14. Colheita de exsudado nasal bacteriológico..... | 25 |
| 15. Colheita de exsudado ocular | 26 |
| 16. Colheita de produtos biológicos para exame micológico | 26 |
| Fase analítica | 28 |
| Coloração de Gram..... | 28 |
| Coloração de Ziehl-Neelsen | 29 |
| Coloração de azul metileno..... | 30 |
| Meios de Cultura | 30 |
| Meios Sólidos | 31 |
| Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS) | 31 |

| | |
|--|----|
| Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2) | 31 |
| Gelose chromID™ Strepto B (STRB)..... | 31 |
| Gelose Chapman 2 (MSA2)..... | 32 |
| Gelose CHROMID® Candida (CAN2) | 32 |
| Gelose chromID® CPS® Elite (CPSE)..... | 32 |
| Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)..... | 33 |
| Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (SAB CHL ACTI-T) | 33 |
| Agar Hektoen..... | 33 |
| Gelose chromID™ CARBA (CARB) | 33 |
| Meios Líquidos | 34 |
| Caldo Selenito F (SELENITO F-T) | 34 |
| Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T) | 34 |
| Provas bioquímicas..... | 34 |
| Procedimentos culturais | 36 |
| 1.1 Urocultura | 36 |
| 2.1 Pesquisa de parasitas nas fezes | 41 |
| 3.1 Coprocultura..... | 43 |
| 4.1 Espermocultura | 45 |
| 5.1 Expetoração: exame micológico e bacteriológico..... | 47 |
| 6.1 Hemocultura..... | 48 |
| 7.1 Exsudado vaginal | 49 |
| 8.1 Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo B no exsudado vaginal e retal | 51 |
| 9.1 Exsudado uretral | 52 |
| 10.1 Exsudado purulento superficial..... | 53 |
| 11.1 Exsudado retal..... | 54 |
| 12.1 Exame bacteriológico dos exsudados oro-faríngeo e amigdalino..... | 54 |
| 13.1 Exsudado auricular | 56 |
| 14.1 Exsudado nasal | 56 |
| 15.1 Exame bacteriológico do exsudado ocular..... | 57 |
| 16.1 Pesquisa fungos não leveduriformes ou filamentosos | 58 |
| Métodos de identificação automatizados..... | 59 |
| Fase pós-analítica | 62 |
| Colorações..... | 63 |

| | |
|---|----|
| 1.2 Urocultura | 63 |
| 2.2 Pesquisa de parasitas nas fezes | 64 |
| 3.2 Coprocultura..... | 64 |
| 4.2 Espermocultura | 64 |
| 5.2 Expetoração..... | 64 |
| 6.2 Hemocultura..... | 65 |
| 7.2 Exsudado vaginal..... | 65 |
| 8.2 Pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico do grupo B no exsudado vaginal | 65 |
| 9.2. Exsudado uretral | 65 |
| 10.2 Exsudado purulento | 65 |
| 11.2 Exsudado retal com pesquisa de enterobactérias produtoras de carbapenemases | 66 |
| 12.2 Exsudado orofaríngeo e amigdalino..... | 66 |
| 13.2 Exsudado auricular | 66 |
| 14.2 Exsudado nasal..... | 66 |
| 15.2 Exame bacteriológico do exsudado ocular..... | 66 |
| 16.2 Pesquisa fungos não leveduriformes ou filamentosos | 67 |
| Considerações finais..... | 68 |
| Referências Bibliográficas | 69 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Interferências, conservação e volume de amostra para urocultura | 17 |
| Tabela 2 – Recomendações, conservação, volume de amostra e processamento no laboratório de amostra de fezes para parasitológico | 18 |
| Tabela 3 – Conservação, volume e processamento no laboratório de amostra de fezes para coprocultura..... | 19 |
| Tabela 4 – Conservação e processamento da amostra de esperma para espermocultura..... | 19 |
| Tabela 5 – Interferências, conservação e processamento de expetoração..... | 20 |
| Tabela 6 – Volume, processamento e conservação de hemocultura | 21 |
| Tabela 7 – Processamento e conservação do exsudado vaginal | 21 |
| Tabela 8 – Recomendações, conservação e processamento de exsudado vaginal para pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico do grupo B | 22 |
| Tabela 9 – Conservação e processamento de exsudado uretral | 23 |
| Tabela 10 – Conservação e processamento de exsudado purulento superficial..... | 23 |
| Tabela 11 - Conservação e processamento de exsudado retal..... | 24 |
| Tabela 12 - Conservação e processamento de exsudado faríngeo..... | 24 |

| | |
|--|----|
| Tabela 13 - Conservação e processamento de exsudado auricular | 25 |
| Tabela 14 - Conservação e processamento de exsudado nasal | 26 |
| Tabela 15 - Conservação e processamento de exsudado ocular | 26 |
| Tabela 16 – Interferências, conservação e processamento de produtos biológicos para exame micológico | 27 |
| Tabela 17 - Resultados esperados no teste catalase | 35 |
| Tabela 18 - Resultados esperados no teste indol | 35 |
| Tabela 19 - Coloração, meio de cultura, atmosfera e tempo de incubação do exame cultural de urina | 41 |
| Tabela 20 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural de fezes | 44 |
| Tabela 21 - Colorações, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural de esperma..... | 47 |
| Tabela 22 - Microrganismos presentes no trato uretral inferior | 47 |
| Tabela 23 – Colorações, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural de expectoração | 48 |
| Tabela 24 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação de hemocultura..... | 49 |
| Tabela 25 - Microrganismos comumente encontrados no trato geniturinário | 50 |
| Tabela 26 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural vaginal | 50 |
| Tabela 27 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação usados na pesquisa de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico do grupo B no exsudado vaginal e retal | 51 |
| Tabela 28 - Exames microscópicos, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação do exsudado uretral | 53 |
| Tabela 29 - Microrganismos que pertencem à flora normal da pele..... | 53 |
| Tabela 30 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado purulento superficial..... | 54 |
| Tabela 31 – Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado retal..... | 54 |
| Tabela 32 - Microrganismos encontrados na orofaringe..... | 55 |
| Tabela 33 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural dos exsudados oro-faríngeo e amigdalino..... | 55 |
| Tabela 34 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado auricular..... | 56 |
| Tabela 35 - Microrganismos presente na flora normal nasal | 57 |
| Tabela 36 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado nasal..... | 57 |
| Tabela 37 - Microrganismos que fazem parte da flora saprófita a nível do saco conjuntival | 58 |
| Tabela 38 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado ocular | 58 |
| Tabela 39 - Microrganismos encontrados na pele..... | 59 |
| Tabela 40 - Cartas VITEK® 2..... | 61 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Escherichia coli</i> em meio de cultura CPSE | 32 |
| Figura 2 – Equipamento automatizado AuxionMax e Sedimax | 39 |
| Figura 3 - Sementeira de urina | 41 |
| Figura 4 - Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> | 43 |
| Figura 5 - Teste Campylobacter | 45 |
| Figura 6 – Preparação da suspensão | 60 |
| Figura 7 – Colocação da rack no VITEK® 2 | 61 |

Lista de abreviaturas

BAAR - Bacilos ácido-álcool resistentes
BKN - Não se observaram bacilos ácido-álcool resistentes
BKP - Observação de bacilos ácido-álcool resistentes
CAN2 - Gelose CHROMID® Candida
CARB - Gelose chromID™ CARBA
CFL - Câmara de fluxo laminar
CMI - Concentração mínima inibitória
COS - Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro
CPSE - Gelose chromID® CPS® Elite
EPC- Enterobactérias produtoras de carbapenemases
HAE2 - Gelose Chocolate Haemophilus 2
ITU - Infecção do trato urinário
MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes
MSA2 - Gelose Chapman 2
NHDV - Não houve desenvolvimento valorizável
SAB CHL ACTI-T - Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona
STRB - Gelose chromID™ Strepto B
TODD H-T - Caldo Todd Hewitt + Antibióticos
TSA - Teste de sensibilidade a antibióticos
VCA3 - Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3
ZN - Ziehl-Neelsen

Introdução

A presente dissertação refere-se ao estágio realizado na seção de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas José Manuel Chau, S.A., no âmbito do Mestrado em Microbiologia, frequentado na Universidade de Aveiro. O estágio decorreu entre setembro de 2019 e junho de 2020 sob a orientação da Professora Doutora Adelaide Almeida e com colaboração da diretora técnica do Laboratório de Análises Clínicas José Manuel Chau, S.A., Dra. Ana Filipa Paredes.

O Grupo Beatriz Godinho foi fundado em 1974 com a criação do Labeto - Centro de Análises Bioquímicas de Leiria, fundado em Pousos pelo Dr. Amado Tomaz e pela Dra. Beatriz Godinho. Baseado numa política de proximidade com o utente os laboratórios estão atualmente em Leiria (Labeto), Coimbra (Laboratório José Manuel Chau) e Seia (Seialab) representados por mais de 150 postos de colheita distribuídos geograficamente de forma significativa na região centro do país. No Grupo o investimento em inovação quer em equipamentos, quer em formação técnica dos colaboradores tem sido uma constante.

O Laboratório José Manuel Chau, S.A., está dividido em diferentes seções, Receção, Sala de Colheitas, Bioquímica e Imunologia, Hematologia, Urianálise e Microbiologia.

A seção de Microbiologia onde decorreu o estágio ao contrário das outras seções é um espaço fechado constituído por câmara de fluxo laminar (CFL), bancada de trabalho com microscópio ótico, frigorífico onde estão armazenados os meios de cultura (líquidos e sólidos), as cartas de identificação e as cartas de sensibilidade a antibióticos, e pelo aparelho VITEK® 2 onde são realizados os testes de sensibilidade a antibióticos e a identificação de estirpes bacterianas. As amostras biológicas que são encaminhadas para a seção de Microbiologia dão entrada na seção da Urianálise onde é feita a sua triagem.

No laboratório as ferramentas para identificar estirpes microbianas é o cultivo e microscopia, embora tenham limitações ainda são técnicas bastante utilizadas.

Durante vários anos, a classificação fenotípica foi a única abordagem de identificação. Os métodos fenotípicos foram baseados em chaves dicotómicas e o primeiro teste realizado foi a coloração de Gram, seguida de testes de catalase e oxidase. Depois passaram a ser usados testes de metabolismo de proteínas e aminoácidos, como a produção de indol ⁽¹⁾.

No final do século XX, surgiram ferramentas moleculares e bancos de dados de sequências. Estes métodos contribuíram significativamente para o aumento do número de espécies microbianas conhecidas ⁽¹⁾.

A identificação de microrganismos a partir do cultivo tem como objetivo obter uma cultura pura, ao usar mecanismos de incubação apropriados, é possível obter culturas puras de microrganismos aeróbios e anaeróbios em placas de meio sólido. Abordagens genéticas são particularmente importantes para microrganismos não cultiváveis, são métodos rápidos e fáceis de identificação ⁽¹⁾.

O objetivo da dissertação prende-se à explicação de técnicas usadas na rotina laboratorial nas diferentes fases analíticas com o propósito de identificar os microrganismos causadores de infecção e respetivo antibiograma.

Fase pré-analítica

A fase pré-analítica é a mais propensa a erros no fluxo de trabalho. Esta fase inclui, interpretação do pedido clínico, colheita da amostra e identificação da amostra, transporte, armazenamento e processamento ⁽²⁾.

Na fase pré-analítica é fundamental que sejam seguidos todos os procedimentos de colheita de forma a que a amostra obtida seja de qualidade para possibilitar uma correta identificação do(s) microrganismo(s) causadores de infeção.

A viabilidade dos microrganismos depende de vários fatores, como tempo de transporte, período de armazenamento e temperatura ⁽³⁾.

Após a colheita, a amostra deve ser transportada para o laboratório no menor tempo possível. Tempos de transporte excessivos podem afetar negativamente os resultados devido à morte de microrganismos exigentes ou ao crescimento excessivo de microrganismos não exigentes ⁽⁴⁾.

O tempo de transporte também é importante, porque quanto mais cedo a amostra chega ao laboratório, mais cedo é cultivada. Atrasos no transporte levam a atrasos no resultado cultural ⁽⁴⁾.

O transporte das amostras para o laboratório central provenientes dos postos de colheitas deve ser feito de forma a respeitar as condições de temperatura adequadas, bem como os recipientes das amostras devem ser protegidos de forma a que não sejam danificados e não haja perda da amostra ⁽²⁾.

O laboratório funciona sob um sistema de identificação por códigos de barras que é atribuído a cada utente, também denominado por número de tubo. O número presente no código de barras consta na requisição do utente, bem como em todas as suas amostras.

Aquando da admissão do utente é necessária a recolha de diversas informações, tais como nome completo, contacto telefónico, data de nascimento, se está ou não gestante, data da última menstruação (no caso de senhoras em período fértil), sintomatologia, toma de medicação, no caso de a colheita ter sido realizada pelo utente inquirir se as instruções de colheita foram seguidas, são fatores a ter em conta na avaliação dos resultados.

Instruções de colheita

A colheita de amostras em microbiologia clínica é de extrema importância. É fundamental assegurar que a colheita segue determinados procedimentos de modo a obter uma amostra de qualidade. Uma colheita adequada consiste no uso de recipiente adequado, transporte e temperatura. É da responsabilidade do técnico de colheitas ou do próprio utente seguir as

instruções do laboratório. A interpretação correta dos resultados analíticos só é possível quando as instruções de colheita são cumpridas ⁽⁴⁾.

1. Colheita de urina para urocultura

A colheita, transporte da amostra pelo utente para o posto de colheitas/laboratório, a aceitação da amostra pelo técnico no posto de colheitas/laboratório, a preparação da amostra e o transporte para a seção são fontes importantes onde podem ocorrer erros ⁽⁵⁾.

Para a realização de urocultura o utente deve colher, preferencialmente, a primeira urina da manhã para um frasco estéril fornecido pelo laboratório. Caso não seja a primeira urina da manhã deve ser colhida uma amostra após 2 horas da micção anterior, preferencialmente.

Colheita em homens:

1. Lavar as mãos com sabão.
2. Imediatamente antes da colheita, lavar a glândula e o meato urinário, com água abundante e sabão (sem desinfetantes).
3. Enxaguar completamente e limpar.
4. Destapar o frasco estéril, evitando tocar com os dedos no interior do frasco e da tampa.
5. Desprezar o primeiro jato para a sanita, o jato intermédio para o frasco esterilizado e o restante, novamente para a sanita.
6. Entregar o frasco bem fechado, o mais rápido possível, mantendo-o em lugar fresco.

Colheita em mulheres:

1. Lavar as mãos com sabão.
2. Lavar os órgãos genitais externos e zonas próximas com água e sabão (sem desinfetantes), da frente para trás.
3. Enxaguar completamente e limpar.
4. Destapar o frasco estéril, evitando tocar com os dedos no interior do frasco e da tampa.
5. Desprezar o primeiro jato para a sanita, o jato intermédio para o frasco esterilizado e o restante novamente para a sanita.
6. Entregar o frasco bem fechado, o mais rápido possível, mantendo-o em lugar fresco.

Colheita em bebês

1. A colheita é realizada em coletores pediátricos esterilizados e é da responsabilidade do técnico de colheitas.
2. O técnico deve lavar as mãos com água e sabão.
3. Antes da colheita lavar a zona genital do bebê, com água e sabão (não usar desinfetantes).
4. Enxaguar completamente e limpar de preferência com gaze ou algodão esterilizado.
5. Colocar o coletor pediátrico:
 - a. No caso dos meninos, o pênis deve ser introduzido na metade superior da abertura do saco. A abertura do saco tem um adesivo autocolante que não magoa e será colado ao períneo.
 - b. No caso das meninas, a abertura do saco deve ser aplicada na metade superior do órgão genital.
6. Recolher a urina do saco pediátrico com uma seringa e colocar num frasco esterilizado.
7. Se o bebê não urinar num espaço de 30 minutos, o saco deve ser substituído por outro, a fim de evitar contaminação fecal, e repetir todo o processo desde o início.

Colheita em algaliados

De preferência realizar a colheita quando substituir a algália. Nunca recolher a urina do saco. Não desconectar a algália para a recolha de urina.

1. Clampar a algália.
2. Desinfetar a área a puncionar (borracha do tubo coletor) como se fosse pele.
3. Aspirar com seringa e passar para um recipiente esterilizado.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório as amostras de urina para urocultura possuem tempo de conservação até à sua entrega no laboratório, bem como tempo de conservação no laboratório até à sua destruição, possuem ainda volume de amostra recomendado e indicações de possíveis interferências descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Interferências, conservação e volume de amostra para urocultura

| Amostra | Interferências | Conservação da amostra até à entrega no laboratório | Volume de amostra colhida | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|--|--|----------------------------------|---|---|
| Urina | Toma de antibióticos, aplicação de pomadas com antibiótico na área genital | Entrega no laboratório no máximo até 2 horas após ter urinado. | Cerca de 20mL | No próprio dia de recolha 3 a 5 horas depois da entrada no laboratório. | Refrigerado durante 24 horas |

No caso de um procedimento de recolha incorreto, a amostra deve ser rejeitada e solicitar nova recolha.

Colheita de fezes

2. Colheita de fezes para exame parasitológico

Colher as fezes em recipiente estéril (tantas amostras quantas o médico indicar, colhidas em dias consecutivos) a quantidade não deve exceder o tamanho de uma noz, evitar a contaminação com urina. A(s) amostra(s) deve(m) ser enviada(s) para o laboratório à temperatura ambiente ou sob refrigeração. Recomenda-se a entrega de cada amostra no próprio dia de recolha mesmo quando tem mais do que uma amostra.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório as amostras de fezes para parasitológico possuem tempo de conservação até à sua entrega no laboratório, bem como tempo de conservação no laboratório até à sua destruição, possuem ainda volume de amostra recomendado e recomendações de colheita descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Recomendações, conservação, volume de amostra e processamento no laboratório de amostra de fezes para parasitológico

| Amostra | Recomendações | Conservação da amostra até à entrega no laboratório | Volume de amostra colhida | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|--|--|----------------------------------|---|---|
| Fezes | Se o parasita for visível a olho nu deve ser colhido e enviado separadamente | Conservar à temperatura ambiente entrega no próprio dia | Amostra do tamanho de uma noz | No próprio dia de recolha 3 a 5 horas depois da entrada no laboratório. | Refrigerado durante 24 horas |

3. Colheita de fezes para coprocultura

Para o diagnóstico laboratorial em caso de doença gastrointestinal, para deteção de *Salmonella/Shigella*, as amostras de fezes devem ser colhidas nos estágios iniciais da doença, preferencialmente antes do início da toma de antibiótico ⁽⁶⁾.

As fezes devem ser colhidas para um recipiente estéril, cerca de 1 a 2 gramas, escolhendo a porção com pus, muco ou sangue. Não processar amostras contaminadas com urina. Semear logo que possível, não é recomendável aceitar colheitas com mais de 24 horas.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório as amostras de fezes para coprocultura possuem tempo de conservação até à sua entrega no laboratório, bem como tempo de conservação no laboratório até à sua destruição, possuem ainda volume de amostra recomendado descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Conservação, volume e processamento no laboratório de amostra de fezes para coprocultura

| Amostra | Conservação da amostra até à entrega no laboratório | Volume de amostra colhida | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|--|----------------------------------|---|---|
| Fezes | Conservar à temperatura ambiente entrega no próprio dia | Amostra do tamanho de uma noz | No próprio dia de recolha 3 a 5 horas depois da entrada no laboratório. | Refrigerado durante 48 horas |

4. Colheita de esperma para espermocultura

Em primeiro lugar o utente deve urinar, lavar as mãos e o pénis com sabão e secar. Efetuar a colheita para recipiente estéril fornecido pelo laboratório. A amostra pode ser colhida por masturbação nunca por interrupção do coito, nem utilizando preservativos, no laboratório/posto de colheitas ou em casa do utente.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório as amostras de esperma para espermocultura possuem tempo de conservação até à sua entrega no laboratório, bem como tempo de conservação no laboratório até à sua destruição e como é processada no laboratório descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Conservação e processamento da amostra de esperma para espermocultura

| Amostra | Conservação da amostra até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|--|--|---|
| Esperma | Conservar à temperatura ambiente até 12 horas | No próprio dia de recolha 3 a 5 horas depois da entrada no laboratório | Refrigerado durante 24 horas |

5. Colheita de expetoração para exame bacteriológico e micológico

Colheita em recipiente estéril fornecido pelo laboratório. A expetoração deve ser colhida, de preferência, ao levantar de manhã, após higiene oral com água mineral. A obtenção da colheita da expetoração deve ser realizada após tosse profunda provocada (desprezar amostras de saliva). Enviar ao laboratório o mais rápido possível. Conservar a 4°C até entregar a amostra no laboratório.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório as amostras de expetoração possuem tempo de conservação até à sua entrega no laboratório, bem como tempo de conservação no laboratório até à sua destruição, como são processadas no laboratório e possíveis interferências descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Interferências, conservação e processamento de expetoração

| Amostra | Interferências | Conservação da amostra até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|-----------------------|--|-------------------------------------|---|
| Expetoração | Toma de antibióticos | Conservar à temperatura ambiente entrega no próprio dia | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 horas |

6. Colheita de sangue para hemocultura

Para colheita de sangue para hemocultura é imperativo desinfetar a pele antes da colheita, caso contrário a microbiota da pele pode resultar numa cultura falso-positiva ⁽⁴⁾.

A hemocultura é um teste microbiológico que é fortemente dependente dos procedimentos clínicos corretos como o período de colheita da amostra, quantidade de amostra colhida, número de amostras colhidas e a avaliação dos sintomas clínicos ⁽⁷⁾.

A colheita deve ser realizada, preferencialmente, antes do pico febril, porque no pico febril há lise bacteriana e a quantidade bacteriana diminui ⁽⁷⁾. O frasco de hemocultura deve estar à temperatura ambiente. Limpar a borracha do frasco a inocular com álcool a 70%. Limpar o local de punção com álcool 70% e deixar atuar durante 30 segundos. Não mudar de agulha para inocular o frasco. Depois de inocular o frasco misturar o sangue por inversão lenta para evitar a

coagulação. Nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita. No laboratório colocar na estufa a 37°C.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório as amostras de sangue para hemocultura possuem volume recomendado, como é feito o seu processamento no laboratório e tempo de conservação da amostra até à sua destruição descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Volume, processamento e conservação de hemocultura

| Amostra | Volume | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|---|-------------------------------------|---|
| Sangue | Recolher por frasco: 10mL adulto e 1-5mL para crianças. | No próprio dia de recolha | Na estufa a 37°C até 28 dias. |

Colheita de exsudados

7. Colheita de exsudado vaginal

No dia da colheita, deverá fazer a higienização apenas com água evitando irrigação para o interior da vagina, não ter relações sexuais antes da colheita, não pode estar menstruada e não estar a tomar/aplicar antibióticos e/ou antimicóticos (sob a forma de óvulos ou pomadas).

Com uma zaragatoa de carvão colher a secreção vaginal. Repetir o procedimento com a zaragatoa seca sem meio de cultura.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado vaginal estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Processamento e conservação do exsudado vaginal

| Amostra | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|------------------|-------------------------------------|---|
| Exsudado vaginal | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24horas |

8. Colheita de exsudado vaginal para pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B

No dia da colheita não deve ser feita a higiene matinal, não deve estar a tomar/aplicar antibióticos ou pomadas locais e não deve ter relações sexuais antes da colheita.

Colher secreção vaginal, com zaragatoa estéril com meio de transporte apropriado para a sementeira (não usar meio de carvão).

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o exsudado vaginal para pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B o processamento e conservação da amostra estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Recomendações, conservação e processamento de exsudado vaginal para pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B

| Amostra | Recomendações | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|------------------|---|--|------------------------------|--|
| Exsudado vaginal | O rastreio do <i>Streptococcus</i> β hemolítico do grupo B: deve ser realizado a todas as grávidas entre as 35 e 37 semanas de gestação | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24horas |

9. Colheita de exsudado uretral

Para a colheita o utente não deve ter lavado a zona uretral com desinfetantes, ter urinado há menos de 3horas, ter tido relações sexuais antes da colheita e ter aplicado pomadas locais. Administração de antibióticos e antimicóticos orais pode interferir no resultado do exame.

Colher a secreção uretral com zaragatoa estéril sem meio de transporte com um movimento de rotação cerca de um centímetro dentro da uretra para o exame direto. Preparar 2 lâminas (uma para a coloração de Gram outra para a coloração de azul metileno) com a amostra colhida. De seguida, introduzir uma zaragatoa flexível estéril na uretra, cerca de 2 a 4cm, tentar rodar e colocá-la em meio de transporte (meio de carvão).

Quando é pedido a pesquisa de *Chlamydia* no exsudado uretral a colheita é feita com uso de kit de recolha específico.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado uretral estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Conservação e processamento de exsudado uretral

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|------------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado uretral | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 48horas |

10. Colheita de exsudado purulento superficial

Para realização da colheita o utente não deve estar a tomar antibióticos, estar a aplicar pomadas e ter lavado a ferida recentemente com desinfetantes.

Indicar o local de colheita no processo do utente. Limpar a zona a analisar com soro fisiológico. Efetuar a colheita na zona mais afetada, eventualmente com pus usando uma zaragatoa com meio de transporte.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado purulento superficial estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Conservação e processamento de exsudado purulento superficial

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado purulento superficial | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48horas |

11. Colheita de exsudado retal

Introduzir a zaragatoa estéril através do esfíncter anal e rodá-la contra as criptas retais, deixar 10-30 segundos e retirar.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado retal estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Conservação e processamento de exsudado retal

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado retal | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48 horas |

12. Colheita de exsudado faríngeo

Para realização da colheita, o utente não deve comer, não usar desinfetantes orais, não deve estar a tomar antibióticos e/ou antimicóticos.

Colheita realizada com zaragatoa normal meio de transporte. Pedir ao utente para respirar fundo com a boca bem aberta. Com o auxílio da espátula pressionar a língua. Passar com a zaragatoa em toda a superfície da faringe e amígdalas com aspeto patológico (vermelho, onde se verifique existir inflamação com pus ou “pontos brancos”). Evitar o contacto da zaragatoa com a língua, com as gengivas ou com a saliva.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado faríngeo estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Conservação e processamento de exsudado faríngeo

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|-------------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado faríngeo | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48 horas |

13. Colheita de exsudado auricular direito e esquerdo

Para realizar a colheita o utente não deve lavar a zona da colheita, aplicar gotas auriculares ou pomadas na véspera e no dia da colheita, não estar a tomar antibiótico e/ou antimicótico.

Colheita realizada com duas zaragatoas com meio de transporte. Introduzir a zaragatoa apenas no canal auditivo externo, não forçando a entrada. Canal auditivo médio ou interno, a colheita deve ser realizada pelo médico. Identificar as zaragatoas indicando o ouvido a que pertence cada uma.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado auricular estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Conservação e processamento de exsudado auricular

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|--------------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado auricular | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48 horas |

14. Colheita de exsudado nasal bacteriológico

Para a colheita o utente deve evitar assoar-se e utilizar desinfetantes na zona de colheita na véspera e no dia da colheita, não tomar/aplicar de antibióticos, antimicóticos e pomadas, inalar sprays nasais (até 5 dias antes da colheita).

A colheita é realizada com duas zaragatoas flexíveis finas estéreis com meio de transporte. Para cada uma das narinas, introduzir cada zaragatoa independentemente, em cada uma das narinas (esquerda e direita) até encontrar resistência. Fazer um movimento de rotação, retirar a zaragatoa e introduzi-la no tubo de proteção com meio de transporte. Identificar devidamente cada uma das zaragatoas anotando a qual das narinas se refere.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado nasal estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 - Conservação e processamento de exsudado nasal

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|----------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado nasal | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48 horas |

15. Colheita de exsudado ocular

Para realização da colheita o utente não deve aplicar gotas ou pomadas ou uso de anestésicos tópicos na véspera e no dia da colheita, não aplicar antibióticos e antimicóticos por via oral e/ou pomadas até 5 dias antes da colheita.

Se for Dacrioadenite/Dacriocistite, infeção das glândulas lacrimais, colher, com uma zaragatoa com meio de transporte, a secreção lacrimal e nas margens superior e inferior da pálpebra. Se for Blefarite, infeção aguda ou crónica da margem da pálpebra envolvendo a pele e pestanas, molhar a zaragatoa em soro fisiológico e passá-la ao longo da margem superior e inferior da pálpebra. Se for nos dois olhos utilizar zaragatoas diferentes. Colheitas da conjuntiva, queratite (infeção da córnea) e endoftalmite (infeção da cavidade ocular e tecido intraocular) devem ser feitas sempre por um médico.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento e conservação do exsudado ocular estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 - Conservação e processamento de exsudado ocular

| Amostra | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|-----------------|---|-------------------------------------|---|
| Exsudado ocular | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48 horas |

16. Colheita de produtos biológicos para exame micológico

A colheita da amostra do tecido queratinoso (unha, cabelo, barba, pele) e raspagem da zona periférica envolvente deve ser colhida para recipiente estéril (caixa de Petri).

Cabelos/pêlos: Os cabelos devem ser retirados da periferia da lesão com o auxílio de uma pinça esterilizada e recolhidos para o interior de uma caixa de Petri esterilizada.

Unhas: Com o auxílio de um bisturi fazer um raspado da unha, principalmente, entre o tecido saudável e o tecido infectado (observar o aspeto da unha com zonas esbranquiçadas, lascadas). Cortar a unha e raspar junto à pele. O produto é colhido para uma caixa de Petri esterilizada. Posteriormente, passa-se com uma zaragatoa seca embebida em soro fisiológico de forma a recolher alguns esporos ou leveduras que possam estar presentes.

Pele: Antes da colheita da amostra deve-se desinfetar a zona com álcool 70%. Nas infeções de pele o material biológico deve ser colhido a partir da fronteira entre o tecido doente e o saudável. Com o auxílio do bisturi devem ser raspadas escamas da pele da lesão para o interior da caixa de Petri esterilizada. No fim, passar com uma zaragatoa embebida em soro fisiológico de forma a recolher alguns esporos ou leveduras que possam existir.

De acordo com o manual de procedimentos do laboratório o processamento, interferências e conservação de produtos biológicos para exame micológico estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 – Interferências, conservação e processamento de produtos biológicos para exame micológico

| Amostra | Interferências | Conservação até à entrega no laboratório | Processamento no laboratório | Conservação da amostra no laboratório até à sua destruição |
|---|--|---|-------------------------------------|---|
| Produtos biológicos para exame micológico | Tratamento e lavagem com antimicóticos. No caso de tratamento com antimicóticos deve-se esperar 4 a 5 dias para fazer a colheita | Temperatura ambiente | No próprio dia de recolha | Refrigerado durante 24 a 48 horas |

Fase analítica

A fase analítica consiste na análise da amostra. Após o processamento da amostra, o cultivo das amostras em meios de cultura fornecerá os resultados. Na seção de Microbiologia clínica a identificação dos microrganismos pode ser realizada por métodos culturais e métodos bioquímicos que são usados como auxílio na identificação de algumas estirpes. Os testes de sensibilidade a antibióticos são realizados com recurso a sistemas automatizados ⁽²⁾.

No laboratório as amostras colhidas não devem ser deixadas à temperatura ambiente, especialmente se for necessária refrigeração para preservar a amostra. A viabilidade dos microrganismos poderá diminuir dependendo de vários fatores incluindo temperatura e condições de armazenamento. Além disso, os microrganismos da microbiota podem replicar-se e causar crescimento excessivo, levando a resultados falso-positivos ⁽²⁾.

Na chegada das amostras ao laboratório, precauções devem ser tomadas para manipular as amostras de forma a reduzir a exposição a microrganismos patogénicos. As amostras devem ser manuseadas na câmara de fluxo laminar de forma a minimizar o risco para o pessoal do laboratório e para o meio ambiente, bem como para evitar a contaminação da amostra que está a ser manuseada ⁽²⁾.

A cultura bacteriana pura permanece essencial para a identificação da estirpe bacteriana causadora de infeção e estudo da suscetibilidade aos antibióticos. As condições de cultura variam com o tempo de incubação, os nutrientes, a atmosfera e a temperatura. A maioria das espécies implicadas na microbiologia clínica são espécies bacterianas mesofílicas que crescem a temperaturas médias de 25 °C a 45 °C ⁽³⁾.

No que diz respeito a tempo de incubação a maioria dos microrganismos cresce facilmente entre 24 e 48 horas em meio sólido ⁽³⁾.

Coloração de Gram

Foi em 1884 que Hans Christian Gram, médico dinamarquês desenvolveu uma técnica de coloração diferencial que ainda hoje é o princípio base da identificação bacteriana. O protocolo de coloração sequencial em várias etapas separa as bactérias de acordo com a estrutura da parede celular em de Gram-positivo e de Gram-negativo ⁽⁸⁾.

A coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial, pois reage de maneira diferente com diferentes tipos de bactérias, com base na estrutura da parede celular. Bactérias com uma camada espessa de peptidoglicano retêm o primeiro corante, cristal violeta, adquirindo uma cor roxa, são designados de Gram-positivo. As bactérias que possuem uma camada fina de

peptidoglicano (1 a 3nm), seguida por uma camada fina designada por membrana externa (7 a 8nm), são descoradas pelo diferenciador, álcool-acetona e adquirem tom vermelho, pela retenção do segundo corante, safranina, e são designadas de Gram-negativo. Esta técnica é útil para fins taxonómicos, diagnóstico preliminar e avaliação da pureza da cultura ⁽⁸⁾.

A coloração de Gram é feita de forma manual, respeitando os diferentes tempos entre corantes após fixação à chama do esfregaço na lâmina.

Procedimento coloração de Gram

- 1) Identificar a lâmina com o número de tubo da amostra.
- 2) Cobrir o esfregaço com a solução cristal violeta e deixar atuar durante 1 minuto.
- 3) Lavar a lâmina com água destilada.
- 4) Cobrir a lâmina com solução de lugol deixando atuar 1 minuto.
- 5) Lavar a lâmina com água destilada.
- 6) Cobrir a lâmina com solução de álcool acetona e deixar atuar durante 15 segundos.
- 7) Lavar a lâmina com água destilada.
- 8) Cobrir a lâmina com solução de safranina e deixar atuar durante 1 minuto.
- 9) Lavar a lâmina com água destilada.
- 10) Deixar secar a lâmina ao ar.
- 11) Visualização da lâmina por microscopia ótica.

Coloração de Ziehl-Neelsen

A coloração convencional de Ziehl-Neelsen (ZN) é um método rápido, útil e prático para detetar bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). A parede celular de algumas bactérias do género *Mycobacterium* possui ácido micólico que o torna impermeável à coloração por soluções aquosas ⁽⁹⁾.

Procedimento coloração de Ziehl-Neelsen

- 1) Identificar a lâmina com o número de tubo da amostra.
- 2) Fixar o esfregaço à chama.
- 3) Após a lâmina arrefecer cobrir o esfregaço com solução de fucsina e deixar atuar durante 5 minutos.
- 4) Lavar a lâmina com água destilada.
- 5) Cobrir a lâmina com solução álcool-ácido 3% durante 15 segundos.
- 6) Lavar a lâmina com água destilada.

- 7) Cobrir a lâmina com solução de verde malaquita deixar atuar durante 1 minuto.
- 8) Lavar a lâmina com água destilada.
- 9) Deixar secar a lâmina ao ar.
- 10) Visualização da lâmina por microscopia ótica.

Coloração de azul metileno

A coloração com azul de metileno é um método de coloração simples usado para visualizar mais facilmente o contraste entre bactérias e outro tipo de células. Esta coloração facilita a visualização de gonococos, por vezes mais fáceis de visualizar nesta coloração.

Procedimento:

- 1) Identificar a lâmina com o número de tubo do utente.
- 2) Fazer o esfregaço deixando o secar ao ar e depois fixá-lo à chama.
- 3) Cobrir a lâmina com solução corante azul de metileno.
- 4) Deixar atuar durante 3 minutos.
- 5) Lavar a lâmina com água destilada.
- 6) Deixar secar a lâmina ao ar.
- 7) Visualização da lâmina por microscopia ótica.

Meios de Cultura

A base para grande parte do que sabemos sobre microrganismos é baseada na capacidade de os cultivar *in vitro*. Uma variedade de meios, incluindo meios líquidos e meios solidificados com agar, foi desenvolvida para este objetivo ⁽¹⁰⁾.

Os meios de cultura não seletivos não contêm nenhum inibidor. Infusões de carne ou extratos de coração ou cérebro foram os substratos iniciais usados empiricamente. Peptonas, são fontes de hidratos de carbono, definidas como produtos solúveis da hidrólise enzimática de proteínas, são mais frequentemente usadas como aditivos nutricionais nos meios de cultura. Diversas enzimas podem ser distinguidas, e os diversos substratos são carne, caseína, soja e gelatina ⁽³⁾. Exemplo meio de cultura Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS).

Meios enriquecidos são projetados para facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. O principal componente de enriquecimento é o sangue, que fornece hemina e outros nutrientes. Esse componente é frequentemente adicionado a meios comerciais para aumentar notavelmente

o crescimento de espécies bacterianas anaeróbias ⁽³⁾. Exemplo meio de cultura Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2).

Meios de cultura seletivo constituídos por componentes orgânicos, inorgânicos e minerais. Os ácidos desoxicólicos, bem como os sais biliares são frequentemente usados como inibidores de bactérias de Gram-positivo ⁽³⁾. Exemplo meio de cultura Mackconkey.

Meios Sólidos

Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)

A gelose Columbia contém uma mistura de peptonas que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. A presença de sangue de carneiro, torna o meio rico em nutrientes adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, permite a expressão da hemólise, que serve de critério base para a orientação da identificação de alguns microrganismos. Esta gelose permite ainda o isolamento de microrganismos anaeróbios ⁽¹¹⁾.

Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2)

A gelose Chocolate Haemophilus 2 é um meio seletivo para o isolamento das diferentes espécies de Haemophilus. O isolamento de Haemophilus em produtos biológicos provenientes das vias respiratórias ou em amostras de origem genital é frequentemente difícil devido à presença de uma flora associada importante. A gelose Chocolate Haemophilus 2 é composta por uma base nutritiva rica em factores X (hemina) e V (NAD). A seletividade do meio é obtida através da associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das bactérias de Gram-positivo e das leveduras ⁽¹²⁾.

Gelose chromID™ Strepto B (STRB)

Meio cromogénico seletivo utilizado na deteção dos estreptococos do grupo B (*S. agalactiae*) em mulheres grávidas e em recém-nascidos a partir de amostras biológicas. O *S. agalactiae* é responsável por infeções graves no recém-nascido (meningite). A gelose chromID™ Strepto B é constituída por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas, 3 substratos cromogénicos e antibióticos. Estes componentes permitem detetar *S. agalactiae* através do aparecimento de colónias que variam entre o rosa pálido e o vermelho. A maioria das outras espécies bacterianas e leveduras não se desenvolvem neste meio ou não formam colónias características ⁽¹³⁾.

Gelose Chapman 2 (MSA2)

Este meio destina-se ao isolamento seletivo dos *Staphylococcus* em amostras de origem humana. Os microrganismos que fermentam o manitol formam colónias amarelas. Esta característica é um critério de orientação para a identificação de *Staphylococcus aureus*. O elevado teor em cloreto de sódio do meio limita o desenvolvimento de certas bactérias que não *Staphylococcus* ⁽¹⁴⁾.

Gelose CHROMID® Candida (CAN2)

Meio cromogénico para o isolamento seletivo das leveduras e identificação direta de *Candida albicans* e à diferenciação presuntiva de um grupo de espécies composto por *C. tropicalis*, *C. lusitanae* e *C. kefyr*. A hidrólise específica de um substrato cromogénico de hexosaminidase na presença de um indutor da enzima provoca a coloração azul das colónias de *C. albicans*. A eventual hidrólise de um segundo substrato permite diferenciar as culturas mistas e orientar a identificação de outras espécies. As colónias que hidrolisam este substrato são cor de rosa. A mistura inibe o crescimento da maioria das bactérias ⁽¹⁵⁾.

Gelose chromID® CPS® Elite (CPSE)

A gelose chromID® CPS® Elite é um meio de isolamento, contagem e identificação bacteriana na urina. Permite a contagem microbiana de bactérias através de métodos de inoculação padronizados. A gelose chromID® CPS® Elite é constituída por uma base muito rica de diferentes peptonas e substratos cromogénicos que permite a deteção de atividade enzimática específica. A deteção de indol é favorecida pelo triptofano presente na gelose. A elevada concentração de agar evita a invasão por *Proteus*. Este meio permite a identificação direta de *Escherichia coli* (Figura 1) por coloração espontânea num tom vermelho a carmim ⁽¹⁶⁾.

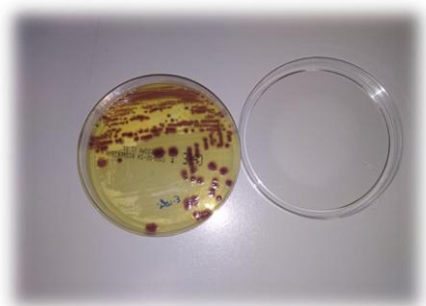


Figura 1 - *Escherichia coli* em meio de cultura CPSE

Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)

Meio de isolamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* em amostras polimicrobianas. Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX™3. A seletividade é obtida por associação de antibióticos e antifúngicos que permitem inibir a maioria das outras bactérias e leveduras que não as espécies pesquisadas ⁽¹⁷⁾.

Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (SAB CHL ACTI-T)

A gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona é um meio seletivo recomendado para a cultura de algumas espécies de fungos filamentosos (em especial, os dermatófitos) a partir de colheitas polimicrobianas.

A presença de peptonas e de glucose favorece o desenvolvimento das estirpes fúngicas. A seletividade do meio em relação à maioria das bactérias é assegurada pelo cloranfenicol ⁽¹⁸⁾.

Agar Hektoen

O Agar Hektoen é um meio de isolamento seletivo e de diferenciação destinado à pesquisa das *Salmonella* e *Shigella* a partir de colheitas de fezes.

Os microrganismos que fermentam um dos três açúcares contidos neste meio originam colônias amarelas, colônias verdes ou azuis-esverdeadas. Os microrganismos que produzem H₂S originam colônias com centro negro. A presença de colônias verdes ou azuis-esverdeadas com ou sem centro negro (colônias características) representa uma forte presunção de *Salmonella* ou de *Shigella*. A inibição dos microrganismos de Gram-positivo é obtida com uma mistura de sais biliares e de corantes ⁽¹⁹⁾.

Gelose chromID™ CARBA (CARB)

A gelose chromID™ CARBA é um meio seletivo destinado ao rastreamento das enterobactérias produtoras de carbapenemases (EPC). Esta gelose é constituída por uma base nutritiva rica que associa diferentes peptonas, contém uma mistura de antibióticos que permite o crescimento seletivo de EPC. Três substratos cromogénicos que permitem identificar as EPC: *Escherichia coli*: coloração rosa a bordo, das estirpes produtoras de β-glucuronidase e/ou β-galactosidase. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*: coloração espontânea azul-esverdeada a azul-acinzentada das estirpes que exprimem uma β-glucosidase ⁽²⁰⁾.

Meios Líquidos

Caldo Selenito F (SELENITO F-T)

Este meio destina-se ao enriquecimento da *Salmonella* a partir das fezes. A sua composição em peptona de caseína e de carne (bovina e porcina), lactose (bovina), fosfato de sódio, selenito ácido de sódio e água destilada, favorece o crescimento das *Salmonella* no seio de uma flora polimicrobiana. Após a etapa de enriquecimento, o caldo Selenito F deve ser repicado para meios destinados à deteção da *Salmonella* ⁽²¹⁾.

Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T)

O caldo Todd-Hewitt + Antibióticos é um caldo de enriquecimento seletivo destinado à deteção dos estreptococos do grupo B na mulher grávida. A sua composição favorece o crescimento dos estreptococos no seio de uma flora polimicrobiana. Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria dos microrganismos de Gram-negativo da flora de acompanhamento. Após a etapa de enriquecimento, a cultura em caldo Todd-Hewitt + Antibióticos deve ser repicado para meios destinados à deteção dos estreptococos ⁽²²⁾.

Provas bioquímicas

- Prova da catalase

Esta prova permite evidenciar a presença de catalase. Permite assim a diferenciação presuntiva das bactérias que possuem esta característica. A presença de catalase é detetada nos microrganismos por libertação de oxigénio a partir de água oxigenada. Para a reação é usado o reagente ID color Catalase composto por solução de água oxigenada a 3%, agente espessante e azul Evans.

Procedimento do teste em lâmina:

- 1) Colocar na lâmina uma gota de ID color Catalase.
- 2) Dispersar 1 a 2 colónias na gota com a ajuda da ansa.

Resultados: a presença de catalase traduz-se pela emissão imediata de bolhas de oxigénio de acordo com a Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados esperados no teste catalase

| Estirpe | Catalase | Reação |
|------------------------------|----------|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | Ocorre emissão imediata de bolhas de oxigénio |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | - | Não ocorre emissão de bolhas de oxigénio |

- Teste do Indol

Este reagente permite evidenciar a produção de indol, permitindo a diferenciação das bactérias que possuem esta característica.

Deteção da produção de indol: a partir de colónias isoladas na gelose chromIDTM CPS® (contendo triptofano), as bactérias que possuem uma triptofanase degradam o triptofano libertando indol. Para a deteção da produção de indol é utilizado o reagente R1 constituído por dimetilaminomaldeído, ácido clorídrico e água destilada.

Procedimento:

- 1) É colocado reagente R1 num disco de cor branca.
- 2) Com a ansa são retiradas algumas colónias da gelose chromIDTM CPS®.
- 3) Misturar as colónias no reagente R1.
- 4) O aparecimento da coloração azul indica uma reação positiva, a coloração rosa indica reação negativa.

Os resultados esperados no teste do indol estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados esperados no teste indol

| Estirpe | Indol | Cor da reação |
|--------------------------|-------|---------------|
| <i>Escherichia coli</i> | + | Azul |
| <i>Proteus mirabilis</i> | - | Rosa |

Procedimentos culturais

1.1 Urocultura

Amostras do trato urinário, são as amostras mais frequentes e em maior número processadas na seção de Microbiologia. Os resultados são determinados pela qualidade da amostra e como é transportada para o laboratório dado que a uretra é colonizada por um elevado número de microrganismos. A introdução destes microrganismos durante a colheita da amostra ou a contaminação da amostra com microrganismos da flora vaginal ou fecal pode comprometer a amostra. Instruções específicas devem ser fornecidas a cada utente para que no momento da colheita de urina o risco de contaminação seja minimizado ⁽¹⁰⁾.

As infeções do trato urinário (ITU) estão entre infeções bacterianas mais comuns ⁽²³⁾.

As ITU são um problema de saúde frequente, caracterizado pela presença de microrganismos patogénicos no trato urinário, incluindo rins, ureteres, bexiga ou uretra. A ITU é mais comum em mulheres devido à uretra mais curta, maior proximidade do ânus com a vagina, além da entrada mais fácil de microrganismos patogénicos por atividade sexual. Na gravidez é considerada a infeção bacteriana mais comum devido às alterações hormonais e anatómicas que favorecem uma ITU ⁽²⁴⁾.

No entanto, homens de ambos os extremos do espectro etário (principalmente bebés com idade inferior a 1 ano de idade e homens com idade superior a 65 anos de idade com hipertrofia prostática) apresentam maior incidência de ITU, outras condições nos homens (diabetes, lesão medular, cateterismo) também promovem ITU ⁽²⁵⁾.

Os microrganismos patogénicos associados à bacteriúria sintomática e assintomática são *Escherichia coli*, responsáveis por até 86% dos casos, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Proteus* spp, *Enterococcus* spp, *Streptococcus* do grupo B ⁽²⁴⁾.

A metodologia padrão no diagnóstico de infeção do trato urinário (ITU) é a deteção do patogénico na presença de sintomas clínicos. O agente patogénico é detetado e identificado pela cultura de urina (urocultura), sendo também feita uma estimativa do número de bactérias presente na amostra ⁽²⁶⁾.

O exame químico de urina é usado para pesquisa de proteínas, leucócitos, glóbulos vermelhos e nitritos. Os nitritos positivos sugerem presença de bactérias de Gram-negativo, como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Enterobacter*, pois estes microrganismos convertem nitratos em nitritos, no entanto o teste será negativo na presença de espécies de Gram-positivo, como *Staphylococcus*

ou *Streptococcus*. A visualização do sedimento urinário por microscopia também pode ser útil na detecção de bactérias ⁽²⁴⁾.

A urina embora seja um produto residual, contém uma enorme quantidade de informações. Procedimentos bem padronizados de colheita, transporte e análise de amostras são a base de uma estratégia de diagnóstico eficaz para a análise de urina. Como a colheita é feita pelo próprio utente, a análise de urina é muito suscetível a problemas pré-analíticos ⁽⁵⁾.

Durante décadas, a análise microscópica de sedimentos urinários tem sido a técnica padrão, a introdução de novas tecnologias e automatização melhorou a precisão e a produtividade do processo ⁽⁵⁾.

O pedido médico referente à análise de urina varia de análise sumária de urina, análise sumária mais urocultura com eventual TSA ou apenas urocultura com eventual TSA. Quando o pedido refere análise sumária no boletim de resultados é emitido com o resultado da química (cor, glicose, pH, urobilinogénio, proteínas, cetonas, densidade, nitratos), bem como o resultado do sedimento urinário (leucócitos, eritrócitos, células epiteliais) e caso existam é ainda feita a referência à presença de cristais (cristais de oxalato de cálcio, cristais de ácido úrico, cristais de trifosfato) e leveduras. Quando o pedido do clínico apenas refere urocultura no boletim de resultados, embora seja feita a análise química esta não é referida no boletim. O resultado da urocultura contempla o resultado do sedimento urinário, quantificação e resultado do eventual TSA com os antibióticos testados referindo a sua sensibilidade: sensível /intermédio/resistente.

As amostras provenientes dos diferentes postos de colheitas, bem como as do laboratório dão entrada pelo programa eDeia pelo número de tubo através de um sistema de leitura de código de barras, aquando da entrada do produto é possível ver qual o pedido que cada amostra apresenta, as amostras com pedido de urocultura são colocadas na mala térmica com cuvette de gelo até ao momento da sementeira. Do frasco de colheita é feito um tubo (transparente de fundo redondo, que permite uma melhor ressuspensão do sedimento após centrifugação) devidamente identificado com o respetivo código de barras é este tubo que passa no aparelho (AutionMax) onde é feita a análise química e caso a análise química dê alterações é avaliado o sedimento urinário no aparelho semi-automatizado Sedimax.

Este método automatizado combina o exame semi-quantitativo do teste da tira de urina com a microscopia de sedimentos.

Análise sumária de urina

Esta análise engloba dois tipos de determinação: 1) análise semi-quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos: cor, glicose, ácidos biliares, acetona, pH, proteínas, urobilinogénio, nitritos. 2) sedimento urinário – estimativa semi-quantitativa do número de elementos figurados presentes na amostra.

Descrição da técnica

Análise química

Analisam-se os seguintes parâmetros: cor, glicose, ácidos biliares, acetona, densidade, pH, proteínas, urobilinogénio e nitritos de um modo manual ou automático, usando tiras reativas apropriadas. As tiras fornecem outras informações que são usadas como orientação, não saindo como resultado final (ex: leucócitos, sangue e turvação).

Procedimento manual

- 1) Homogeneizar a urina.
- 2) Encher o tubo de ensaio devidamente identificado com cerca de 10mL de urina.
- 3) Mergulhar a tira na urina, retirar o excesso de urina com o papel higiénico.
- 4) Fazer a leitura da tira de acordo com a escala colorimétrica que acompanha as tiras.

Procedimento automático

- 1) Homogeneizar a urina.
- 2) Encher o tubo devidamente rotulado com o código de barras com a urina (cerca de 10mL).
- 3) Analisar as amostras fazendo a leitura automática no equipamento.

Análise do sedimento urinário

Procedimento manual

- 1) Homogeneizar a amostra de urina.
- 2) Encher o tubo de centrifuga devidamente identificado.
- 3) Centrifugar a amostra de urina, a uma velocidade de 2500rpm durante 5 minutos.
- 4) Rejeitar o sobrenadante (mais ou menos 9mL) e ressuspender o sedimento no volume remanescente no tubo.

- 5) Colocar um pouco do sedimento urinário ressuspendido numa lâmina e cobrir com uma lamela.
- 6) Identificar e semi-quantificar os elementos do sedimento observando vários campos ao microscópio com a objetiva de 40x. Para semi-quantificar os cilindros pode usar-se também a objetiva de 10x.

Procedimento automático

- 1) Homogeneizar a amostra de urina.
- 2) Encher um tubo devidamente rotulado com o código de barras com a urina (cerca de 10mL).
- 3) Fazer a leitura da amostra no aparelho automático de leitura de tiras e analisador automático de sedimentos (Figura 2).
- 4) Analisar os resultados das séries obtidas nos aparelhos, se estiverem em conformidade com os critérios de aceitação de resultados dos aparelhos, podem gravar-se.



Figura 2 – Equipamento automatizado AuxionMax e Sedimax

Um sedimento normal contém algumas células e cilindros, embora em número limitado. É difícil definir com precisão um sedimento normal, contudo a presença de um ou dois glóbulos vermelhos por campo (40x), ou quatro leucócitos e algumas células epiteliais não se considera

necessariamente anormal. A urina de mulheres idosas pode conter um número elevado de células epiteliais escamosas, procedentes das paredes vaginais.

Critérios de aceitação/rejeição de resultados

Sedimento urinário

- 1) Determinação manual: os glóbulos vermelhos, leucócitos e células epiteliais são referidos convencionalmente em termos de células por campo de elevado poder de resolução (40x), os cilindros contam-se por campo de baixo poder de resolução (10x). Para determinação deve ser contado número de elementos em alguns campos e a média referida como valor final. Outros elementos como bactérias, cristais e espermatozóides são referidos como raros, alguns e abundantes.
- 2) Determinação automática: contagem obtida pelo aparelho, atendendo às limitações do próprio aparelho, o resultado poderá ser modificado pelo técnico após observação microscópica do sedimento pelo método manual.

Nota: Na rotina laboratorial é usado o procedimento automatizado devido ao elevado número de amostras, o procedimento manual aplica-se em casos de avaria do aparelho, em caso de necessidade de confirmações ou quando o volume de amostra é insuficiente.

Exame cultural

- a) Sementeira em meio de cultura CPSE (Figura 3) para quantificação e identificação dos microrganismos presentes na amostra.

Exame bacteriológico: com a ansa de 10µl semear a urina (depois de homogeneizada) em meio de cultura CPSE, incubar o meio de cultura inoculado 18 a 24 horas na estufa a 37±2°C de acordo com a Tabela 19. Após o tempo de incubação, observar o crescimento das colónias e quantificar o número de microrganismos.

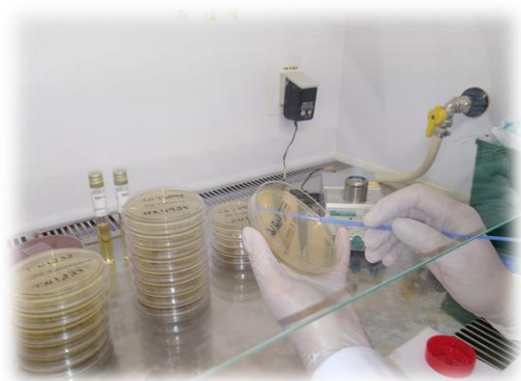


Figura 3 - Sementeira de urina

Inoculação:

Inocular a amostra usando uma ansa de 10 μ l, imergir a ansa na urina, segurando-a na vertical e traçar o raio da placa para distribuir a urina, a seguir fazer traços perpendiculares por toda a superfície da placa.

Tabela 19 - Coloração, meio de cultura, atmosfera e tempo de incubação do exame cultural de urina

| | |
|--------------------|---------------------------|
| Lâmina | Gram (eventualmente) |
| Meio de cultura | CPSE |
| Atmosfera | 37 \pm 2°C em aerobiose |
| Tempo de incubação | 18 a 24horas |

2.1 Pesquisa de parasitas nas fezes

As manifestações clínicas de infecções parasitárias do trato gastrointestinal variam dependendo do parasita, bem como de uma variedade de fatores do hospedeiro, indivíduos com respostas imunes comprometidas geralmente apresentam doenças mais graves. A duração da parasitose e a carga de parasitas também afetam as manifestações clínicas da doença ⁽²⁷⁾.

Infeções do trato gastrointestinal na forma de gastroenterite, enterite ou enterocolite são comuns em certos parasitas intestinais, como *Giardia lamblia* (*Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) *Cryptosporidium parvum* ou *Cryptosporidium hominis* e *Entamoeba histolytica*. Essas infecções geralmente manifestam-se com dor abdominal, inchaço e diarreia ⁽²⁷⁾.

A detecção de parasitas é subdividida em duas fases:

1. Exame macroscópico, onde se observa a consistência das fezes e a presença de parasitas.
2. Exame microscópico, onde se observa o sedimento proveniente do método de concentração de parasitas ao microscópio ótico.

Método de concentração com recurso aos tubos de concentração de parasitas PARAKON

Os tubos de concentração de parasitas proporcionam medições higiénicas e precisas de ovos, larvas e protozoários. O tubo de concentração de parasitas funciona com um sistema de filtração de três camadas. O parakon permite examinar amostras de fezes humanas ou animais num sistema totalmente fechado. Com a ajuda da formalina e de Triton X, o reagente estabiliza os parasitas e separa-os dos restantes resíduos presentes nas fezes.

Este dispositivo tem 3 seções diferentes. Uma espátula para recolher a amostra, um sistema de filtração para separar as fezes dos parasitas e um tubo de centrifugação integrado.

Procedimento:

- 1) Recolher a amostra com a colher do dispositivo.
- 2) Colocar a amostra no copo de mistura.
- 3) Deixar repousar de 1 a 24 horas com o cone de mistura voltado para cima.
- 4) No final do tempo de repouso colocar a amostra a centrifugar durante 2 minutos a 1000rpm com o cone voltado para baixo.
- 5) Desprezar o sobrenadante, adicionar à preparação uma gota de lugol, identificar a lâmina com o número da amostra, colocar uma gota da preparação com pipeta de Pasteur, cobrir com uma lamela e observar ao microscópio, primeiro com baixa ampliação (10x) e depois com ampliação maior (40x) para melhor observação da morfologia.

A detecção e identificação de organismos dependem de critérios morfológicos. Os artefatos encontrados em amostras fecais podem assemelhar-se a parasitas, desta forma são utilizadas tabelas com tamanhos e características de várias formas parasitárias encontradas para auxiliar na identificação. A Figura 4 representa um ovo de *Ascaris lumbricoides* visualizado durante o período de estágio.

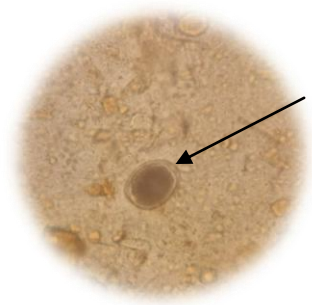


Figura 4 - Ovo de *Ascaris lumbricoides*

3.1 Coprocultura

As fezes devem ser inoculadas em caldos de enriquecimento, além de culturas em placas. Os caldos de enriquecimento servem para permitir o crescimento de *Salmonella* enquanto suprimem o crescimento da flora fecal normal e assim, podem melhorar o rendimento da recuperação ⁽⁶⁾.

Para a detecção de *Salmonella* nas fezes, as amostras podem ser cultivadas em Hektoen, as colónias neste meio são de cor verde-azuladas e no centro preto, as colónias de *Shigella* são verdes claras ⁽⁶⁾.

A *Salmonella* é um membro das Enterobacteriaceae, caracterizada pela capacidade de metabolizar o citrato como fonte de carbono e a lisina como fonte de nitrogénio, bem como pela sua capacidade de produzir sulfeto de hidrogénio ⁽⁶⁾.

Membros do género *Salmonella* causam um quadro característico de doenças como a febre tifóide, a gastroenterite aguda transmitida por alimentos e a enterocolite são as formas mais comuns de infeção por *Salmonella* ⁽⁶⁾.

O cultivo de fezes tem por objetivo detecção de microrganismos patogénicos causadores de infeções do trato gastrointestinal.

O exame microbiológico das fezes consiste na sementeira de microrganismos: faz-se sempre a pesquisa de *Salmonella* e *Shigella*, num meio selectivo Hektoen e meio de enriquecimento Selenito de acordo com a Tabela 20. Podem-se semear outros meios dependendo do pedido médico e de acordo com a opinião da diretora técnica.

Procedimento de cultura em meio sólido Hektoen

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.
2. As amostras são tratadas em CFL em condições de assepsia.
3. Colocar 1 a 2 g de fezes ou 0,5 a 1 ml de fezes líquidas com o auxílio de zaragatoa.

4. Com a ansa fazer a sementeira por quadrantes.
5. Incubar na estufa a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.
6. Fazer a leitura das placas no final do tempo de incubação.

Procedimento de cultura em Caldo Selenito

1. Deixar os tubos atingir a temperatura ambiente.
2. As amostras são tratadas em CFL em condições de assepsia.
3. Semear 1 a 2 g de fezes ou 0,5 a 1 ml de fezes líquidas com auxílio da zaragatoa.
4. Agitar para homogeneizar.
5. Incubar os tubos na estufa a 37°C durante 24 horas.
6. Repicar 10 μl para o meio de isolamento selectivo Hektoen
7. Incubar o meio de isolamento a 37°C durante 24 horas.

Tabela 20 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural de fezes

| | | |
|--------------------|--------------|--|
| Meios de cultura | Meio sólido | Hektoen |
| | Meio líquido | Caldo Selenito |
| Atmosfera | | $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em aerobiose |
| Tempo de incubação | | 18 a 48 horas |

Para pesquisa de *Campylobacter jejuni* é feito através de teste rápido. A Campilobacteriose é uma doença infecciosa causada pela bactéria do género *Campylobacter*. A maior parte das pessoas que contraem campilobacteriose apresentam sintomas de diarreia, dores abdominais e febre, entre 2 a 5 dias após a exposição ao organismo. A diarreia pode conter sangue e ser acompanhada por náuseas e vômitos. A doença normalmente dura uma semana.

Princípio do método

O teste *Campylobacter* Balea é um ensaio imunocromatográfico qualitativo para a determinação de *Campylobacter* em amostras de fezes humanas. A membrana é pré-revestida com anticorpos monoclonais, na região do teste, em oposição aos antígenos *C. jejuni*.

Durante o teste, a amostra irá reagir com o conjugado colorido (microesferas em poliestireno de anticorpos vermelhos monoclonais de anti-*C. jejuni*) que foi pré-desidratado na tira de teste. A mistura move-se então no sentido ascendente de membrana por ação capilar. À medida que a amostra se mistura com a membrana, as partículas coloridas migram. Em caso de resultado

positivo, os anticorpos presentes na amostra na membrana irão capturar o conjugado colorido. A mistura continua a mover-se pela membrana até ao anticorpo imobilizado na região de controlo, uma linha de cor verde aparece sempre. A presença desta linha verde serve para: 1) verificar se o volume da amostra é suficiente; 2) verificar se a migração foi realizada 3) controlo interno dos reagentes.

Procedimento:

O kit é constituído por um frasco com solução tampão e a cassete de teste.

- 1) Desenroscar a tampa do frasco e introduzir a pipeta 4 vezes na amostra de fezes para recolher a quantidade suficiente.
- 2) Fechar o frasco já com a amostra de fezes e o tampão.
- 3) Retirar o teste *Campylobacter* Balea do invólucro fechado e utilizar o mais rápido possível.
- 4) Agitar o frasco para assegurar que a amostra se mistura corretamente com o tampão e partir a ponta do frasco.
- 5) Colocar 3 gotas no poço de teste e iniciar a contagem de tempo com o cronómetro.
- 6) Ler o resultado ao fim de 10 minutos, o aparecimento de apenas uma banda indica resultado negativo (Figura 5), o aparecimento de duas bandas indica resultado positivo.



Figura 5 - Teste Campylobacter

4.1 Espermocultura

As infeções do trato geniturinário e consequente inflamação do sistema reprodutor masculino podem comprometer as funções das células espermáticas e interromper os processos da espermatogénese, causando alterações qualitativas e quantitativas dos espermatozoides ⁽²⁸⁾.

Estudos recentes mostram que a presença de bactérias no sémen pode comprometer a qualidade espermática. As bactérias responsáveis pela contaminação do sémen surgem do trato urinário dos pacientes ou podem ser transmitidas pelo parceiro por via sexual ⁽²⁸⁾.

O sémen que passa pelo trato genital é comumente contaminado com cocos de Gram-positivo, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Infeções por *Staphylococcus aureus* no sistema reprodutor

masculino podem levar à diminuição da motilidade espermática, pois a sua persistência pode causar perda de células hospedeiras em germinação ⁽²⁸⁾.

A detecção de bactérias no sémen não sugere necessariamente infecção, pois isolados bacterianos no líquido seminal também podem resultar da contaminação da amostra ou colonização do orifício uretral. Os microrganismos podem afetar diretamente a função reprodutiva, causando aglutinação de espermatozóides móveis ⁽²⁸⁾.

A espermocultura é constituída por duas partes:

a) Exame microscópico: exame direto a fresco para analisar a presença de leucócitos, eritrócitos, bactérias e parasitas (*Trichomonas*), coloração de Gram, para ver o balanço de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo.

b) Exame cultural para pesquisa de microrganismos: A amostra de esperma é semeada em meio de gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio CAN2 (pesquisa de leveduras), meio de gelose chocolate VCA3 (pesquisa de gonococos), meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*). Incubar os meios 37±2°C durante 24 a 48 horas, conforme os meios de acordo com a Tabela 21. Os meios de gelose de sangue e gelose chocolate são colocados na jarra de Gaspak com o repetivo gerador de CO₂, o sistema GasPak produz uma atmosfera contendo ± 10% de CO₂ com saquetas que contem carbonato inorgânico, carvão activado, ácido ascórbico e água. A saqueta reduz rapidamente a concentração de oxigénio no interior do recipiente. Ao mesmo tempo, o carbonato inorgânico produz dióxido de carbono ⁽³⁾. Fazer a leitura das placas após o tempo de incubação, observando o crescimento das colónias.

Tabela 21 - Colorações, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural de esperma

| | |
|--------------------|--|
| Lâminas | Exame a fresco Gram Azul metileno |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* MSA2** CAN2** VCA3* |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Tempo de incubação | 24 a 48horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO₂).

** Em areobiose.

O esperma pode ser contaminado com a flora normal da uretra de acordo com a Tabela 22 ⁽²⁹⁾.

Tabela 22 - Microrganismos presentes no trato uretral inferior

| Comuns | Menos comuns |
|--|----------------|
| <i>Staphylococcus epidermideis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium</i> | <i>E. coli</i> |

5.1 Expetoração: exame micológico e bacteriológico

O estudo da expetoração consiste em:

- a) Exame microscópico: coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies de Gram-positivo e de Gram-negativo, e coloração de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes. Com uma ansa estéril, espalhar um pouco da parte grumosa da expetoração numa lâmina, com outra lâmina pressionar e espalhar por ambas. Deixar secar e levar ao calor para fixar. Usar uma lâmina para coloração de Gram e outra para a coloração de Ziehl-Neelsen.
- b) Sementeira para pesquisa de microrganismos. A amostra é semeada em gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio de Sabouraud (pesquisa de leveduras e *Aspergillus*),

meio de gelose de chocolate HAE2 (pesquisa de *Haemophilus*) e meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*).

Incubar os meios a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas, conforme os meios (o meio de gelose de sangue e gelose de chocolate HAE2 é colocado em atmosfera enriquecida com CO_2 10% com recurso ao gerador de CO_2) de acordo com a Tabela 23. Fazer a leitura das placas após o tempo de incubação, observando se há crescimento de colónias.

Tabela 23 – Colorações, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural de expetoração

| | |
|--------------------|--|
| Lâminas | Gram Ziehl-Neelsen |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* MSA2** Meio Sabouraud** HAE2* |
| Atmosfera | $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO_2).

** Em areobiose.

6.1 Hemocultura

Em condições normais, o sangue é estéril, infeções localizadas ou sistémicas podem levar a que microrganismos entrem na corrente sanguínea através do sistema linfático. A presença de bactérias na corrente sanguínea designa-se por bacteriémia. Na maioria das vezes, essas bactérias são eliminadas rapidamente pelo sistema imunológico. No caso do sistema imunológico ser incapaz de remover as bactérias do sangue, resulta numa infeção da corrente sanguínea. Os microrganismos responsáveis por esta infeção podem ser identificados por hemocultura. Uma hemocultura consiste numa amostra de sangue de um paciente, suspeito de infeção da corrente sanguínea, que é inoculada numa garrafa de hemocultura contendo um caldo que constitui um meio ideal para o crescimento de bactérias. A concentração de bactérias no sangue de pacientes com infeção da corrente sanguínea é muito baixa, desta forma a cultura direta numa placa de agar pode não detetar a presença de bactérias no sangue do paciente. Uma vez que o sangue é

inoculado no frasco de hemocultura, pode ocorrer uma multiplicação adicional das bactérias, levando a um crescimento bacteriano visível⁽³⁰⁾.

No laboratório o frasco deve ir para a estufa a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ a incubar durante 24 horas após este período, fazer a cultura em meio gelose de sangue. Fazer a leitura da placa após o tempo de incubação, observando se há ou não crescimento de colônias. Se a cultura em gelose de sangue for positiva, deve-se identificar o microrganismo e avaliar se é contaminante da pele ou patogénico e neste caso fazer antibiograma. A hemocultura passa por um período de incubação de 7 dias e é semeada em gelose de sangue a cada 24 horas.

No caso de suspeita de brucelose, o período de incubação é de 28 dias a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, fazer repicagens todas as semanas para gelose de sangue em CFL de acordo com a Tabela 24.

O crescimento em gelose de sangue de mais de dois tipos de colônias (possível contaminação durante a colheita), crescimento da flora saprófita da pele, *Staphylococcus* coagulase negativa é o microrganismo mais associado a contaminações. No entanto, nos paciente hemodialisados, ter em atenção que pode ser o agente causal. Nesse, caso convém fazer um exame bacteriológico do cateter. Além disso, confrontar o resultado das três hemoculturas. Crescimento do mesmo agente em todas as hemoculturas sugere agente patogénico. Crescimento de um potencial contaminante numa só hemocultura sugere contaminação.

Tabela 24 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação de hemocultura

| | |
|--------------------|--|
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS) |
| Atmosfera | $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO_2) |
| Tempo de incubação | Até 7 dias 28 dias (em caso de suspeita de Brucelose) |

7.1 Exsudado vaginal

O estudo do exsudado vaginal consiste em:

- a) Exame direto para pesquisa de parasitas, coloração de Gram para avaliação de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo e coloração de azul metileno para melhor visualização dos gonococos.
- b) Sementeira para pesquisa de microrganismos. A secreção vaginal é semeada em gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, bacilos de Gram-negativo)

meio CAN2 (pesquisa de leveduras), gelose chocolate VCA3 (pesquisa de gonococos) e no caso de ser grávida semear também meio de enriquecimento Todd-Hewitt e no dia seguinte semear em Gelose chromID™ Strepto B.

- c) Os microrganismos que normalmente se encontram neste produto biológico que pertencem à flora normal estão descritos na Tabela 25 ⁽³⁰⁾.

Tabela 25 - Microrganismos comumente encontrados no trato geniturinário

| Comuns | Menos comuns |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | <i>Streptococcus do grupo B</i> |
| <i>Bacteroids</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| <i>Clostridium</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Peptostreptococcus</i> | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | |
| <i>Enterococcus</i> | |

Semear para isolamento nos meios de cultura indicados na Tabela 26, de acordo com os tempos de incubação indicados, no final do tempo de incubação observar o crescimento das colónias.

Tabela 26 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural vaginal

| | |
|--------------------|-------------------------|
| Lâminas | Exame direto (a fresco) |
| | Gram |
| | Azul metileno |
| Meios de cultura | Meios sólidos |
| | Meios líquidos |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO₂).

** Em areobiose

***Só nas grávidas

8.1 Pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B no exsudado vaginal e retal

Streptococcus do Grupo B ou *Streptococcus agalactiae* são bactérias de Gram-positivo β -hemolíticas, que constituem a principal causa de infecções neonatais. *Streptococcus* do Grupo B coloniza o trato genital inferior, durante o período de gestação e os neonatos correm risco de infecção. As mulheres colonizadas durante a gestação correm risco de infecção crescente ou transmissão da bactéria ao recém-nascido durante o parto. A infecção ascendente é uma via pela qual as bactérias se movem da vagina até ao útero e penetram nos tecidos gestacionais ⁽³¹⁾.

A prevenção da infecção por *Streptococcus* do Grupo B é complexa e influenciada por vários fatores, incluindo patogenicidade, fatores ligados ao hospedeiro, tais como o microbioma vaginal, e ainda alterações na resistência a antibióticos ⁽³¹⁾.

O estudo consiste na sementeira para pesquisa do microrganismo. A amostra é semeada em meio líquido de enriquecimento Todd Hewitt após o período de incubação é semeado em meio cromogénico específico (STRB) para a pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B após o tempo de incubação é observando o crescimento das colónias de acordo com a Tabela 27.

Tabela 27 - Meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação usados na pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B no exsudado vaginal e retal

| | | |
|--------------------|---------------------|----------------------|
| Meios de cultura | Meio líquido | Todd Hewitt |
| | Meio sólido | Gelose STRB (2º dia) |
| Atmosfera | 37±2°C em aerobiose | |
| Tempo de incubação | 18 a 24 horas | |

Caso não haja aparecimento de colónias suspeitas (colónias de cor rosa), incubar mais 24 horas, no caso de surgirem colónias suspeitas fazer o teste Slidex Strep B. Só após a confirmação deste teste é que se considera um resultado positivo, deve ser confirmado através de identificação da carta GP no Vitek 2.

Slidex *Streptococcus* β -hemolítico

- 1) Colocar 0,3ml de solução de extração de enzima num tubo de hemólise.
- 2) Colocar 4 a 10 colónias de uma cultura fresca de *Streptococcus* e fazer a suspensão.
- 3) Quando as colónias são de tamanho inferior a 5mm, aumentar o inóculo até obter uma turbidez visível a olho nu.

- 4) Incubar de 15 a 45 minutos à temperatura ambiente (18 a 30°C) ou de 10 a 30 minutos a 37°C.

Identificação

- 1) Homogeneizar completamente o reativo de látex por agitação.
- 2) Depositar uma gota de látex em cada um dos círculos na carta de aglutinação.
- 3) Homogeneizar o conteúdo de cada círculo com uma ansa.
- 4) Agitar em movimento circular durante um minuto.
- 5) Uma reação positiva manifesta-se por aglutinação das partículas em látex no prazo de um minuto.
- 6) O tamanho dos aglutinados e a rapidez do seu aparecimento dependem da concentração antigénica do extrato.

Interpretação dos resultados:

- 7) Reação positiva: Aglutinação.
- 8) Reação negativa: Suspensão homogénea.

9.1 Exsudado uretral

O estudo do exsudado uretral consiste em:

- a) Exame direto para pesquisa de parasitas (*Trichomonas*) e observação semiquantitativa de células: leucócitos, eritrócitos e células epiteliais, coloração de azul metileno e coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies de Gram-positivo e de Gram-negativo.
- b) Cultura para pesquisa de microrganismos. A amostra é semeada nos seguintes meios de cultura, gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), gelose CAN2 (pesquisa de leveduras), gelose de chocolate VCA3 (pesquisa de gonococos), meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*).

Incubar os meios a 37±2°C durante 24 a 48 horas, conforme os meios, fazer a leitura das placas após o tempo de incubação, observando o crescimento das colónias de acordo com a Tabela 28.

Tabela 28 - Exames microscópicos, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação do exsudado uretral

| | |
|--------------------|--|
| Lâminas | Exame direto (a fresco) Gram Azul metileno |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* VCA3* MSA2** CAN2** |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respectivo gerador de CO₂).

** Em areobiose.

10.1 Exsudado purulento superficial

O estudo do exsudado purulento (inclui feridas e secreções) consiste em:

- a) Exame microscópico: coloração de Gram para avaliação do número de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo.
- b) Sementeira para pesquisa de microrganismos. A amostra é semeada em meio gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio CAN2 (pesquisa de leveduras) e meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*) meio de Mackonkey (pesquisa de bacilos de Gram-negativo). Os microrganismos normalmente presentes na flora normal neste produto biológico estão descritos na Tabela 29 ⁽³²⁾.

Tabela 29 - Microrganismos que pertencem à flora normal da pele

| Comuns | Menos comuns |
|---------------------------|------------------------------------|
| <i>Candida spp</i> | <i>Streptococcus spp</i> |
| <i>Micrococcus spp</i> | <i>Acetivobacter calcoaceticus</i> |
| <i>Staphylococcus spp</i> | <i>Bacteroids spp</i> |
| <i>Clostridium spp</i> | <i>Moraxella spp</i> |
| <i>Lactobacillus</i> | |

Incubar os meios a 37±2°C durante 24 a 48 horas, conforme os meios, fazer a leitura das placas após o tempo de incubação, observando o crescimento das colônias de acordo com a Tabela 30.

Tabela 30 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado purulento superficial

| | |
|------------------|--|
| Lâmina | Gram |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* MSA2** CAN2** Mackonkey** |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respectivo gerador de CO₂).

** Em aerobiose.

11.1 Exsudado retal

O estudo do exsudado retal consiste na sementeira para pesquisa de Enterobactérias produtoras de carbapenemases. A amostra é semeada em meio CARBA de acordo com a Tabela 31.

Tabela 31 – Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado retal

| | |
|--------------------|---------------------|
| Lâminas | Gram |
| Meios de cultura | CARB |
| Atmosfera | 37±2°C em aerobiose |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

12.1 Exame bacteriológico dos exsudados oro-faríngeo e amigdalino

O estudo do exsudado oro-faríngeo e amigdalino consiste em:

- a) Exame microscópico: coloração de Gram para avaliação do número de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo.

b) Sementeira para pesquisa de microrganismos. A amostra é semeada em gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio CAN2 (pesquisa de leveduras) e meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*). Os microrganismos que normalmente estão presentes neste produto biológico estão descritos na Tabela 32 ⁽³³⁾.

Tabela 32 - Microrganismos encontrados na orofaringe

| Comuns | Menos comuns |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Streptococcus milleri</i> | |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | |
| Anaerobic Streptococci | |
| <i>Bacteroids spp</i> | |
| <i>Prevotella/Porphyromonas</i> | |
| <i>Bacteroids oralis</i> | |

Incubar os meios a 37±2°C durante 24 a 48 horas, conforme os meios, fazer a leitura das placas após o tempo de incubação, observando o crescimento das colónias de acordo com a Tabela 33.

Tabela 33 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural dos exsudados oro-faríngeo e amigdalino

| | |
|--------------------|---|
| Lâmina | Gram |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* MSA2** CAN2** |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO₂).

** Em areobiose.

13.1 Exsudado auricular

O exsudado auricular consiste em:

- a) Exame microscópico: coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies de Gram-positivo e de Gram-negativo.
- b) Sementeira para pesquisa de microrganismos. A amostra é semeada nos seguintes meios de cultura: gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio CAN2 (pesquisa de leveduras), meio de gelose chocolate HAE2 (pesquisa de *Haemophilus*), meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*). Incubar os meios de cultura na estufa a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante, 24 a 48 horas de acordo com a Tabela 34.

Os microrganismos que normalmente se encontram neste produto biológico (flora normal) incluem *Staphylococcus epidermidis* e *Corynebacterium spp.*

Os agentes mais frequentes na otite média: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*.

O agente mais frequente na otite externa: *Pseudomonas*.

Tabela 34 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado auricular.

| | |
|--------------------|--|
| Lâmina | Gram |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* HAE2* CAN2** MSA2** |
| Atmosfera | $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO_2).

** Em areobiose.

14.1 Exsudado nasal

O estudo do exsudado nasal consiste em:

- a) Exame microscópico: coloração de Gram para avaliação do conteúdo em espécies de Gram-positivo e de Gram-negativo.

- b) Sementeira para pesquisa de microrganismos: A amostra é semeada em diferentes meios de cultura: gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus* e outras bactérias patogénicas que crescem neste meio não seletivo), meio CAN2 (pesquisa de leveduras) e meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*). Os microrganismos que normalmente fazem parte da flora normal neste produto biológico encontram-se na Tabela 35 ⁽³⁴⁾.

Tabela 35 - Microrganismos presente na flora normal nasal

| Comuns | Menos comuns |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Moraxella catarrhalis</i> |
| <i>Diphtheroids</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| <i>Streptococcus spp</i> | <i>Moraxella spp</i> |

Incubar os meios a 37±2°C durante 24 a 48 horas, conforme os meios, fazer a leitura das placas após o tempo de incubação de acordo com a Tabela 36.

Tabela 36 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado nasal

| | |
|--------------------|---|
| Lâmina | Gram |
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* CAN2** MSA2** |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO₂).

** Em areobiose.

15.1 Exame bacteriológico do exsudado ocular

O estudo do exsudado ocular consiste em:

- a) Exame microscópico: coloração de Gram para avaliação de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo.

- b) Sementeira para pesquisa de microrganismos: A amostra é semeada em diferentes meios de cultura: gelose de sangue (pesquisa de *Streptococcus*), meio CAN2 (pesquisa de leveduras), meio MSA2 (pesquisa de *Staphylococcus*), gelose de chocolate HAE2 (pesquisa de *Haemophilus*). Após a sementeira a leitura das placas deve ter em conta a quantidade de microrganismos que faça parte da flora saprófita de acordo com a Tabela 37 ⁽³⁵⁾.

Tabela 37 - Microrganismos que fazem parte da flora saprófita a nível do saco conjuntival

| Comuns | Menos comuns |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Streptococcus sp</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Neisseria sp</i> |
| <i>Corynebacterium spp</i> | <i>Moraxella spp</i> |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| | <i>Enterobacteriaceae</i> |

Incubar os meios a 37±2°C durante 24 a 48 horas, conforme os meios, fazer a leitura das placas após o tempo de incubação de acordo com a Tabela 38.

Tabela 38 - Coloração, meios de cultura, atmosfera e tempo de incubação no exame cultural do exsudado ocular

| Lâmina | Gram |
|--------------------|--|
| Meios de cultura | Gelose de sangue (COS)* MSA2** CAN2** HAE2* |
| Atmosfera | 37±2°C |
| Tempo de incubação | 24 a 48 horas |

* Em semi-anaerobiose (jarro de Gaspack com o respetivo gerador de CO₂).

** Em areobiose.

16.1 Pesquisa fungos não leveduriformes ou filamentosos

A incidência mundial de infeções fúngicas tem vindo a aumentar, bem como o número de diferentes fungos que causam infeções também tem aumentado. As infeções fúngicas endémicas causadas por *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis*,

Coccidioides posadasii parecem estar em ascensão. Do mesmo modo, infecções adquiridas no ambiente, como aspergilose, fusariose e mucormicose ⁽³⁶⁾.

A pesquisa de dermatófitos na pele é frequente. Esta pesquisa engloba dois tipos de exames: exame direto e cultural. Para o exame direto, observa-se ao microscópio preparações de tecido queratinoso parcialmente digerido e tornado transparente com uma solução de hidróxido de potássio. A outra parte da amostra é usada para a sementeira em meio Sabouraud com os antibióticos gentamicina e cloranfenicol para inibirem o crescimento de bactérias. Os microrganismos que normalmente se encontram neste produto biológico (flora normal) estão descritos na Tabela 39 ⁽³⁷⁾.

Tabela 39 - Microrganismos encontrados na pele

| Comuns | Menos comuns |
|--------------------------|----------------------------------|
| <i>Candida spp</i> | <i>Streptococcus spp</i> |
| <i>Micrococcus spp</i> | <i>Acetobacter calcoaceticus</i> |
| <i>Staphylococcus sp</i> | <i>Bacteroids spp</i> |
| <i>Clostridium spp</i> | <i>Moraxella spp</i> |
| <i>Lactobacillus</i> | |

Nota: a identificação de fungos devido a exigência de recursos técnicos é feita no Labeto.

Métodos de identificação automatizados

O equipamento VITEK® 2 baseia-se na utilização de cartas com 64 poços para testes bioquímicos, sendo que cada poço contém uma suspensão de um substrato bioquímico ou antibiótico.

Testes de sensibilidade a antibióticos

Os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) são indicados para os microrganismos que causem um processo infeccioso que justifiquem terapia antimicrobiana. O TSA baseia-se em testar a capacidade dos agentes antimicrobianos em inibir o crescimento de isolados clínicos sob condições experimentais padronizadas ⁽³⁸⁾.

O antibiograma convencional baseia-se na detecção fenotípica de crescimento bacteriano, que requer um período de 16 a 24 horas com agentes patogénicos de rápido crescimento ou ainda mais com patogénicos de crescimento lento ⁽³⁸⁾.

As colónias isoladas são selecionadas da placa de gelose e testadas quanto à sua sensibilidade. Os resultados do antibiograma são lidos como concentrações mínimas inibitórias (CMI). A CMI obtida com teste de diluição pode indicar ao clínico a concentração de um antimicrobiano necessária para inibir o microrganismo infeccioso ⁽³⁸⁾.

As CMI são determinadas usando concentrações de um agente antibiótico, e determinada a partir da concentração mais baixa em que ocorre inibição de crescimento, o critério de interpretação é sensível, intermédio e resistente ⁽³⁸⁾.

Procedimento:

- 1) Preparar o tubo de ensaio de plástico (poliestireno) transparente onde são colocados 3 mL de solução salina estéril e colocar na rack que irá aparelho automatizado VITEK® 2.
- 2) São selecionadas colónias isoladas da placa de crescimento.
- 3) Com uma ansa estéril transferir o número suficiente de colónias para o tubo de solução salina.
- 4) Preparar uma suspensão (Figura 6) com densidade de inóculo de 0,60 a 0,69 no padrão de McFarland.
- 5) Proceder à inoculação da carta na suspensão.
- 6) Colocar a rack no aparelho (Figura 7) e proceder à identificação da amostra atribuindo o número de tubo no software do VITEK® 2.



Figura 6 – Preparação da suspensão



Figura 7 – Colocação da rack no VITEK® 2

As cartas disponíveis para identificação e as cartas de sensibilidade a antibióticos estão descritas na Tabela 40.

Tabela 40 - Cartas VITEK® 2

| | |
|----------|--|
| GP | Carta de identificação de Gram-positivos |
| GN | Carta de identificação de Gram-negativos |
| NH | Carta de identificação de <i>Neisseiria</i> e <i>Haemophilus</i> |
| AST-N359 | Carta de sensibilidade para Gram-negativos |
| AST-P586 | Carta de sensibilidade para <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> e <i>S. agalactiae</i> |
| AST-ST03 | Carta de sensibilidade de <i>Streptococcus</i> |
| AST-P648 | Carta de sensibilidade de Gram-positivos |

VITEK® 2 GP carta de Gram-positivo

A carta de identificação de Gram-Positivo VITEK® 2 (GP) é utilizada na identificação automática dos microrganismos de Gram-positivo de maior relevância clínica.

A carta GP baseia-se em métodos bioquímicos que medem a utilização da fonte de carbono, a resistência e a atividade enzimáticas ⁽³⁹⁾.

VITEK® 2 GN carta de identificação de Gram-negativo

A carta de Identificação de Gram-negativo é utilizada para a identificação automática dos bacilos de Gram-negativos fermentadores e não-fermentadores de maior relevância clínica.

A carta GN baseia-se em métodos bioquímicos, que medem a utilização da fonte de carbono, atividade enzimática e resistência ⁽⁴⁰⁾.

VITEK® 2 NH carta de identificação de *Neisseria* e *Haemophilus*

A carta de identificação de *Neisseria* e *Haemophilus* VITEK® 2 (NH) é utilizada para a identificação automática dos microrganismos fastidiosos de maior relevância clínica. A carta NH baseia-se em métodos bioquímicos, que medem a utilização da fonte de carbono e a atividade enzimática ⁽⁴¹⁾.

AST-N359 carta de sensibilidade para de Gram-negativo

A Carta AST-N359 para antibiograma de Gram-negativo destina-se à determinação da sensibilidade de bacilos de Gram-negativo aeróbios com significado clínico a agentes antimicrobianos ⁽⁴²⁾.

AST-P586 Carta de sensibilidade para *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *S. agalactiae*

A Carta AST-P586 para antibiograma de Gram-positivo destina-se à determinação da sensibilidade de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., e *S. agalactiae* a agentes antimicrobianos ⁽⁴³⁾.

VITEK® 2 AST-ST03 carta de sensibilidade de *Streptococcus*

A carta de sensibilidade de *Streptococcus* é utilizada para determinar a sensibilidade de *S.pneumoniae*, *Streptococcus beta-hemolíticos* de *Streptococcus viridans* a agentes antibióticos ⁽⁴⁴⁾.

VITEK® 2 AST-P648 carta de sensibilidade de Gram-positivo

A carta de sensibilidade de Gram-positivo é utilizada para determinar a sensibilidade de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *S. agalactiae* a agentes antibióticos ⁽⁴⁵⁾.

Fase pós-analítica

A fase pós-analítica descreve as etapas executadas após a realização do teste, incluindo a expressão dos resultados para elaboração do boletim de resultados, validação biopatológica pela especialista e entrega do boletim ao utente ⁽²⁾.

Os resultados devem ser relatados com precisão, com as informações suficientes para uma interpretação correta pelo médico ou pelo profissional de saúde que fará o acompanhamento do utente ⁽²⁾.

Em alguns casos, quando é isolado mais do que um microrganismo de uma amostra estes devem ser relatados de maneira organizada de forma a ser bem perceptível para o clínico ⁽²⁾.

Em alguns casos a identificação de um microrganismo pode ser relatada antes do resultado do TSA, podendo ajudar a fornecer opções de tratamento empírico para o paciente, no entanto é

preciso ter em conta que os resultados do TSA promove o uso adequado de antibióticos e tem o potencial de diminuir os custos com a saúde. Após o crescimento de um isolado bacteriano, são fornecidos resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos juntamente com uma interpretação se os microrganismos são sensíveis, intermédios ou resistente aos antimicrobianos testados. Resultados pouco comuns ou inconsistentes de suscetibilidade antimicrobiana devem ser confirmados ⁽²⁾.

O laboratório tem em vigor um procedimento em que a cada amostra (exemplo urocultura demora 3 dias úteis desde a entrega da amostra até à saída do boletim de resultados) tem um tempo de resposta no qual o resultado será relatado, o tempo de resposta é transmitido ao utente no dia da colheita da amostra ⁽²⁾.

Os resultados são retidos informaticamente durante um elevado período de tempo, permitindo uma fácil recuperação, bem como as amostras são guardadas durante um determinado período de tempo, para o caso de necessidade de realização de alguma confirmação ou nova realização do procedimento cultural ⁽²⁾.

Colorações

Expressão dos resultados

- ✓ Gram: Semiquantificação (raros, alguns e abundantes) de cocos e bacilos de Gram-positivo ou de Gram-negativo.
- ✓ Ziel-Neelsen: Não se observaram bacilos ácido-álcool resistentes (BKN) ou observaram-se bacilos ácido-álcool resistentes (BKP).
- ✓ Azul-de-metileno: Técnica auxiliar para visualizar gonococos (deve ser comparada com a coloração de Gram no caso de exsudados vaginais, uretrais e espermoculturas).

1.2 Urocultura

Expressão dos resultados

Exame citológico: número de elementos/campo microscópio e número de elementos/ μ l

Gram: semiquantificação (raros, alguns, abundantes) de cocos ou bacilos de Gram-positivo ou de Gram-negativo, sempre que o número de colónias/ml é $\geq 10^2$.

Exame cultural: quando **não há crescimento bacteriano** no meio de cultura, no exame cultural coloca-se “Negativo” e no número de colónias por mL coloca-se zero (0). Quando **há crescimento bacteriano** no meio de cultura mas o número de colónias por mL é < 1000 , coloca-se “Não houve

desenvolvimento valorizável” (NHDV). Contagem $\geq 10^5$ coloca-se a **identificação bacteriana** e o resultado do **antibiograma** (com base nas diretrizes da Infectious Diseases Society of America).

Sempre que a colheita é efetuada por ordem do médico ou por insistência do utente, estando este a tomar antibiótico, escreve-se em observações “Utente a fazer antibioterapia”.

Sempre que haja repetição da análise deve ser colocado a data da repetição da colheita.

2.2 Pesquisa de parasitas nas fezes

Expressão dos resultados:

Negativo: Não se observam ovos, quistos e parasitas.

Quando se observa é feita a identificação parasitológica.

3.2 Coprocultura

Expressão dos resultados:

Pesquisa de *Shigella*: negativo ou positivo (com antibiograma)

Pesquisa de *Salmonella*: negativo ou positivo (com antibiograma)

Pesquisa de *Campylobacter*: negativo ou positivo.

Nota: Um resultado positivo de *Salmonella* e/ou *Shigella* é confirmado no laboratório do INSA.

4.2 Espermocultura

Expressão dos resultados:

Exame citológico: semiquantificação de leucócitos, eritrócitos, bactérias e parasitas.

Gram: bactérias observadas na coloração.

Bacteriológico cultural: negativo, NHDV ou identificação do microrganismo patogénico e antibiograma.

Micológico: negativo ou identificação da levedura.

5.2 Expetoração

Expressão de resultados:

Gram: bactérias observadas na lâmina corada.

Ziel-Neelsen: Não se observaram bacilos ácido-álcool resistentes (BKN) ou observação de bacilos ácido-álcool resistentes (BKP).

Bacteriológico cultural: NHDV ou identificação da bactéria com antibiograma.

Micológico: negativo ou identificação da levedura.

6.2 Hemocultura

Expressão dos resultados

Gram: negativo ou tipo de bactéria identificada na coloração;

Exame cultural: negativo, identificação do microrganismo patogénico e antibiograma ou indicação de provável contaminante sem TSA.

7.2 Exsudado vaginal

Expressão dos resultados

Gram: negativo ou tipo de bactéria identificada na coloração.

Exame micológico: negativo ou positivo, em caso de positivo com identificação.

Exame cultural bacteriológico: negativo; NHDV; ou identificação da bactéria e antibiograma.

Exame parasitológico: negativo ou identificação da espécie patogénica.

8.2 Pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B no exsudado vaginal

Expressão dos resultados

Positivo ou negativo.

9.2. Exsudado uretral

Expressão dos resultados

Gram: negativo ou tipo de bactéria identificada na coloração.

Micológico: negativo ou identificação da levedura.

Bacteriológico cultural: negativo quando não há crescimento; NHDV; ou identificação da bactéria patogénica e antibiograma.

10.2 Exsudado purulento

Expressão dos resultados

Gram: negativo ou tipo de bactéria identificada na coloração.

Micológico: negativo ou levedura identificada.

Bacteriológico cultural: negativo quando não há crescimento; NHDV; ou identificação da bactéria e antibiograma.

11.2 Exsudado retal com pesquisa de enterobactérias produtoras de carbapenemazes

Expressão dos resultados

Gram: bactérias observadas na coloração.

Bacteriológico cultural: negativo ou identificação do microrganismo patogénico e antibiograma.

12.2 Exsudado orofaríngeo e amigdalino

Expressão dos resultados

Gram: negativo ou tipo de bactéria identificada na coloração.

Exame micológico: negativo ou levedura identificada.

Bacteriológico cultural: negativo; NHDV; ou a identificação da bactéria patogénica e antibiograma.

13.2 Exsudado auricular

Expressão dos resultados

Gram: semiquantificação das bactérias observadas na lâmina corada.

Micológico: negativo ou levedura identificada.

Bacteriológico cultural: negativo, NHDV ou identificação da bactéria e antibiograma.

14.2 Exsudado nasal

Expressão dos resultados

Gram: negativo ou tipo de bactéria identificada na coloração.

Exame micológico: negativo ou a levedura identificada.

Exame cultura bacteriológico: não houve desenvolvimento de bactérias patogénicas, ou identificação da bactéria patogénica e antibiograma. Pouco crescimento de microrganismos encontrados frequentemente na cavidade nasal pode-se semiquantificar o número de colónias em raras e algumas, a estirpe e eventualmente colocar a nota: “a valorizar pelo clínico”. Exemplo: *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA).

15.2 Exame bacteriológico do exsudado ocular

Expressão dos resultados

Gram: bactérias observadas na coloração.

Micológico: negativo ou identificação da levedura identificada.

Bacteriológico cultural: se não houver nenhum desenvolvimento (negativo); não houve desenvolvimento valorizável (NHDV); ou identificação da bactéria patogénica e antibiograma.

16.2 Pesquisa fungos não leveduriformes ou filamentosos

Expressão dos resultados

Produto biológico: descrição.

Exame direto: positivo ou negativo.

Exame cultural: Identificação do fungo, com a avaliação de antifugigrama se for requisitada pelo clínico.

Considerações finais

O laboratório desempenha um papel fundamental como auxílio no diagnóstico diferencial de muitas infecções, no entanto, é importante ter em conta que os seres humanos estabelecem relações simbióticas com diferentes microrganismos em quase todos os locais no corpo, esses microrganismos são designados por microbiota humana. Os membros da microbiota fornecem ao hospedeiro humano serviços essenciais, por exemplo, bactérias metabolizam nutrientes e ainda conferem defesa contra agentes patogénicos.

A possibilidade de ocorrer erros na seção da microbiologia é vasta, podem ocorrer na fase pré-analítica, analítica e pós-analítica. Podem ocorrer erros pré-analíticos na colheita de amostras, identificação inadequada, transporte inapropriado. Embora esteja descrito que a maioria dos erros ocorra na fase pré-analítica é necessário ter em conta todos os procedimentos laboratoriais de forma a eliminar erros na fase pré-analítica, analítica e pós-analítica.

A interpretação dos resultados em microbiologia depende da qualidade das amostras, assim a colheita e o transporte deve respeitar os procedimentos estabelecidos pelo laboratório. Há fatores que são de elevada importância, amostras em que não seja respeitado o procedimento de colheita devem ser rejeitadas, a microbiota normal e comensal pode facilmente contaminar a amostra colhida e comprometer de forma inadequada a interpretação dos resultados, as amostras devem ser colhidas antes da toma de antibióticos, uma vez que os agentes antimicrobianos provocam alterações da microbiota e dos agentes etiológicos podendo levar a resultados culturais potencialmente falsos, os testes de sensibilidade a antibióticos devem ser realizados apenas em isolados clinicamente significativos, a identificação do local específico de colheita (exemplo: local anatómico de ferida superficial), bem como informações clínicas como a sintomatologia são fatores a ter em conta na interpretação dos resultados.

Melhorar a qualidade do analito exige uma clara comunicação entre o clínico, o utente e o laboratório de forma a otimizar o diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas.

Dada a evolução dos métodos a rápida identificação de microrganismos é cada vez mais desafiadora, o cultivo de bactérias é um processo demorado e trabalhoso. O tempo necessário para a identificação de microrganismos com base no cultivo demora de 2 a 5 dias ou até mais em caso de fungos.

Assim uma estratégia para reduzir o tempo de identificação microbiana é o uso de técnicas de biologia molecular. A implementação destas técnicas levam a uma diminuição no tempo de entrega dos resultados e consequentemente o utente começa a fazer terapêutica mais cedo.

Referências Bibliográficas

1. Duarte R, Cernáková L, Kadam S, Kaushik K, Salehi B, Bevilacqua A, Corbo M, Antolak H, Stepie K, Leszczewicz M, Tintino S, Souza V, Rad J, Coutinho H, Martins N, Rodrigues C, (2019), *Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present*, *Microorganisms*: 1-32.
2. Chávez V, (2019), *Sources of pre-analytical, analytical and postanalytical errors in the microbiology laboratory*, *Accurate Results in the Clinical Laboratory*, Second Edition: 377-384.
3. Lagier J, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D, (2015), *Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology*. *Clin Microbiol Rev* 28:208–236.
4. Pence M, Liesman R, (2020), *Clinical Microbiology, Contemporary Practice in Clinical Chemistry*: 981–1002.
5. Delanghe J, Speeckaert M, (2014), *Preanalytical requirements of urinalysis*, *Biochemia Medica*; 24(1):89–104.
6. Dekker J, Frank K, (2015), *Salmonella, Shigella, and Yersinia*, *Clin Lab Med*, 35(2): 225–246.
7. Kristóf K, Júlia Pongrácz J, (2016), *Interpretation of Blood Microbiology Results – Function of the Clinical Microbiologist*, *EJIFCC*; 27(2): 147–155.
8. Moyes R, Reynolds J, Breakwell D, (2009), *Differential Staining of Bacteria: Gram Stain*, *Current Protocols in Microbiology* A.3C.1-A.3C.8.
9. Ahmed G, Mohammed A, Taha A, Almatroudi A, Allemailem K, Babiker A, Alsammani M, (2019), *Comparison of the Microwave-Heated Ziehl-Neelsen Stain and Conventional Ziehl*

– Neelse Method in t he Detection of Acid - Fast Bacilli in Lymph Node Biopsies, Open Access Macedonian Journal of Medical Science; 7(6):903-907.

10. Murray P, (2014), The Clinician and the Microbiology Laboratory, Principles and Practice of Infectious Diseases: 191–223.
11. Meio Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS). Disponível em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/59413001-59414000/Package_Insert_-_11378_-_C_-_pt_-_43041_-_43049.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
12. Meio Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2). Disponível em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/105071001-105072000/Package_Insert_-_12734_-_C1_-_pt_-_43681_-_43689.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
13. Meio Gelose chromID™ Strepto B (STRB). Disponível em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/25396001-25397000/Package_Insert_-_13327_-_G_-_pt_-_43461.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
14. Gelose Chapman 2 (MSA2). Disponível em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/83885001-83886000/Package_Insert_-_04620501_-_pt_-_43671.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
15. Meio CHROMID® Candida Agar (CAN2). Disponível em: https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/118914001-118915000/Package_Insert_-_046708-02_-_pt_-_43631-43639.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

16. Gelose chromID® CPS® Elite (CPSE). Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/46387001-46388000/Package_Insert_-_20787_-_B_-_pt_-_416172_-_416173_-_418206_-_418284.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
17. Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3). Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/86666001-86667000/Package_Insert_-_04588601_-_pt_-_43611.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
18. Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (SAB CHL ACTI-T). Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/104353001-104354000/Package_Insert_-_11961_-_B_-_pt_-_42094.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
19. Agar Hektoen. Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/71384001-71385000/Package_Insert_-_21612_-_E_-_ptBR_-_35100.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
20. Gelose chromID™ CARBA (CARB). Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/30759001-30760000/Package_Insert_-_16900_-_B_-_pt_-_43861.pdf. Acedido em: 10/06/2020.
21. Caldo Selenito F (SELENITO F-T). Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/48364001-48365000/Package_Insert_-_08541_-_F_-_pt_-_42099.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

22. Meio Caldo Todd Hewitt + Antibióticos (TODD H-T). Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/23162001-23163000/Package_Insert_-_12041_-_E_-_pt_-_42116.pdf. Acedido em:
10/06/2020.
23. Wilson M and Gaido L, (2004), Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 38, Issue 8, Pages 1150–1158.
24. Kalinderia K, Delkosa D, Kalinderisb M, Athanasiadis A, Kalogiannidisa L, (2018), Urinary tract infection during pregnancy: current concepts on a common multifaceted problem, *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 38(4):448-453.
25. McLellan L, Hunstad D,(2016), Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook, *Trends Mol Med*; 22(11): 946–957.
26. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk M, Pradier E, (2010), The Diagnosis of Urinary Tract Infection, *Dtsch Arztebl Int* 107(21): 361–7.
27. Garcia L, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge G, Pillai D, Procop G, Ryan N, Shimizu R, Govinda Visvesvarab G, (2018), Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract, *Clin Microbiol Rev*31:e00025-17.
28. Berjis K, Ghiasi M, Sangy S, (2018), Study of seminal infection among an infertile male population in Qom, Iran, and its effect on sperm quality, *Iranian Journal of Mycrobiology*, Volume 10 Number 2, 111-116.
29. Godinho B. Manual de Procedimentos - Exsudado uretral. Revisto a 05-07-2017.
30. Godinho B. Manual de Procedimentos - Exsudado vaginal. Revisto a 05-07-2017.

31. Vornhagen J, Waldorf K, Rajagopal L, (2017), Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity and Prevention Strategies, Trends Microbiol. 25(11): 919–931.
32. Godinho B. Manual de Procedimentos - Exsudados purulentos (inclui feridas e secreções). Revisto a 22-01-2013.
33. Godinho B. Manual de Procedimentos – Exame bacteriológico dos exsudados oro-faríngeo e amigdalino. Revisto a 05-07-2017.
34. Godinho B. Manual de Procedimentos - Exsudado nasal. Revisto a 05-07-2017.
35. Godinho B. Manual de Procedimentos – Exame bacteriológico do exsudado ocular. Revisto a 05-07-2017.
36. Lockharta S, Guarner J, (2019), Emerging and reemerging fungal infections, Published by Elsevier Inc. 36(3):177-181.
37. Godinho B. Manual de Procedimentos – Fungos não leveduriformes ou filamentosos. Revisto a 05-07-2017.
38. Arena F, Giani T, Pollini S, Viaggi B, Pecile P, Rossolini G, (2017), Molecular antibiogram in diagnostic clinical microbiology: advantages and challenges, Future Microbiol. 12(5), 361–364.
39. VITEK® 2 GP. Disponível em:
https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/107159001-107160000/Package_Insert_-_043900-03_-_pt_-_21342.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

40. VITEK® 2 GN. Disponível em:

https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/107228001-107229000/Package_Insert_-_044066-03_-_pt_-_21341.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

41. VITEK® 2 NH. Disponível em:

https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/107221001-107222000/Package_Insert_-_043902-03_-_pt_-_21346.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

42. AST-359. Disponível em:

https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/68250001-68251000/Package_Insert_-_9312847_-_A_-_PT_-_421573.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

43. AST-586. Disponível em:

https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/57430001-57431000/Package_Insert_-_9311543-P1PT1_-_D_-_22276.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

44. VITEK® 2 AST-ST03. Disponível em:

https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/84205001-84206000/Package_Insert_-_046698-01_-_pt_-_421040.pdf. Acedido em: 10/06/2020.

45. AST-648. Disponível em:

https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/62108001-62109000/Package_Insert_-_9312244-P1PT1_-_A_-_420857.pdf. Acedido em: 10/06/2020.