

MINISTÉRIO DA SAÚDE

**Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Serviços de Saúde
Gerência de Controle de Riscos à Saúde**

**Manual de Procedimentos Básicos em
MICROBIOLOGIA CLÍNICA
para o Controle de Infecção Hospitalar**

Módulo I

**Brasília-DF
Setembro 2000**

Ó 2000 - Ministério da Saúde

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

1.^a Edição - 2000

Tiragem: 2.000 exemplares

Edição, distribuição e informações

Ministério da Saúde

Unidade de Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SEPN 515, Bloco B, Edifício Ômega

CEP: 70770-520

Impresso no Brasil/Printed in Brazil

Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar:
Módulo I/Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar – Brasília: ANVISA /
Ministério da Saúde, 2000.

56 p.

ISBN 85-334-0185-X

1. Infecção Hospitalar – Controle. 2. Microbiologia Clínica. I. Brasil. ANVISA Ministério da Saúde.

Sumário

Apresentação

Introdução

1 Requisitos Básicos para Instalação e Funcionamento de um Laboratório de Microbiologia⁹

1.1 Atividades Básicas⁹

1.2 Segurança em Laboratório de Microbiologia

1.2.1 Medidas Gerais de Prevenção

1.2.2 Cuidados Relativos a Produtos Químicos

1.2.3 Cuidados Relativos aos Riscos de Contaminação

1.2.4 Medidas Básicas de Proteção

1.2.5 Medidas a Serem Tomadas em Caso de Acidente

1.2.6 Eliminação de Resíduos, Amostras Clínicas e Material Usado

1.3 Infra-Estrutura Física

1.4 Recursos Materiais

1.5 Recursos Humanos

2 Requisição de Exames Microbiológicos e Identificação de Amostras Clínicas

2.1 Informações Básicas que Devem Constar da Requisição Médica¹⁷

2.2 Informações Relevantes para o Diagnóstico do Processo Infeccioso¹⁸

2.3 Identificação da Amostra¹⁸

2.4 Natureza do Teste Solicitado¹⁹

2.5 Resumo de Itens para Requisição de Análises Microbiológicas²⁰

3 Coleta Microbiológica

3.1 Considerações Gerais

3.2 Considerações de Segurança

3.3 Critérios de Rejeição para Amostras Clínicas Enviadas ao Laboratório de Microbiologia

3.4 Transporte das Amostras

3.5 Instruções de Coleta

3.5.1 Hemoculturas

3.5.2 Ponta de Cateter Intravascular

3.5.3 Ponta de Sonda Vesical

3.5.4 Escarro

3.5.5 Secreção Traqueal

3.5.6 ATT – Aspirado Transtraqueal

3.5.7 Lavado Bronco-Alveolar (BAL)

3.5.8 Secreção de Orofaringe

3.5.9 Fluidos Orgânicos Estéreis

3.5.10 Feridas, Abscessos e Exsudatos

3.5.11 Amostras de Tecidos

3.5.12 Secreção de Ouvido

3.5.13 Secreção Ocular

3.5.14 Material Genital

3.5.15 Secreção Anal

3.5.16 Fezes

3.5.17 Urina

3.6 Anaeróbios

3.6.1 Princípio

3.6.2 Coleta da Amostra

3.6.3 Transporte da Amostra

4 Exames Microscópicos e Coloração

4.1 Direto sem Coloração

4.1.1 Salina

4.1.2 Hidróxido de Potássio

4.1.3 Exame em Campo Escuro

4.1.4 Tinta da China Nanquim)

4.2 Coloração de Gram

4.2.1. Equipamentos e Materiais Necessários

4.2.2 Utilização

4.2.3. Esfregaços

4.2.4 Fixação do Esfregaço

4.2.5 Preparo do Reagente para a Coloração de Gram

4.2.6. Coloração

4.2. 6 Como Reportar os Resultados

4.2.8 Leitura do Gram

4.2.9.Causas Comuns de Erro

4.210 Controle de Qualidade

4.3 Outras Colorações

4.3.1 Coloração de Albert Layborn (Corinebactérias)

4.3.2 Coloração de Flagelos

4.3.3 Coloração de Ziehl-Neelsen

Referências Bibliográficas

Apresentação

Grandes avanços têm sido alcançados nas diferentes áreas envolvidas no Controle das Infecções Hospitalares no Brasil. Constata-se, no entanto, importante deficiência ainda não superada na área de Microbiologia, particularmente pela falta de padronização e atualização de técnicas laboratoriais de interesse hospitalar, e de normas para controle de qualidade.

O Laboratório de Microbiologia participa de modo destacado no suporte às atividades de Controle de Infecção em serviços de saúde, envolvendo-se a partir do processo de Busca Ativa da Vigilância Epidemiológica, tendo por referência as culturas positivas, oferecendo informações sobre a etiologia dos processos infecciosos, bem como sobre a resistência microbiana, apoio às atividades de investigação de surtos, controle de qualidade, programas educacionais, etc.

Há cerca de nove anos, o Ministério da Saúde lançou a primeira edição do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar, com grande aceitação por parte dos profissionais da área.

Com a finalidade de atualizar e ampliar os temas anteriormente abordados, optou-se por uma publicação em módulos sendo, no momento, oferecido o primeiro de uma série de seis. Este Manual fornecerá subsídios para um melhor desempenho dos Laboratórios de Microbiologia, com repercussões diretas na interface com as atividades das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar. Conhecer melhor a etiologia das infecções hospitalares e o seu padrão de susceptibilidade às drogas antimicrobianas, possibilitará a oportunidade não só de aprimorar as informações como as ações de Vigilância Epidemiológica, oferecendo condições para melhor utilização dos antimicrobianos e monitoramento da resistência bacteriana, que terão conseqüências na melhoria da qualidade da assistência médica em nosso país.

Gonzalo Vecina Neto
Diretor Presidente da
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Cláudio Duarte da Fonseca
Secretário de Políticas de Saúde
Ministério da Saúde

Introdução

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

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

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

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

Módulo I - Requisitos básicos para instalação e funcionamento de um laboratório de microbiologia. Requisição de exames microbiológicos. Coleta, conservação e transporte de materiais clínicos. Exames microscópicos e colorações.

Módulo II - Microbiologia das principais síndromes infecciosas.

Módulo III - Processamento dos materiais e identificação dos principais microrganismos de importância médica.

Módulo IV - Principais métodos de detecção da resistência no Laboratório Clínico.

Módulo V - Biossegurança. Controle de Qualidade de meios de cultura, reagentes e equipamentos. Preparo de meios de cultura e corantes.

Módulo VI - Laboratório de Microbiologia e sua interação com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar.

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

1 Requisitos Básicos para Instalação e Funcionamento de um Laboratório de Microbiologia

1.1 Atividades Básicas

As atividades básicas de um Laboratório de Microbiologia consistem em:

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

1.2 Segurança em Laboratório de Microbiologia

Os tempos modernos incorporaram consideráveis avanços nos trabalhos do **Laboratório de Análises Clínicas**. O aumento do número de amostras analisadas e o incremento da demanda, a par da introdução de diversos aparelhos analíticos nas rotinas do laboratório, determinaram cuidados mais criteriosos e expressiva preocupação com os níveis de segurança nessas rotinas de trabalho.

No **Laboratório de Análises Clínicas**, a segurança é de responsabilidade da direção, no sentido de evitar, ao máximo, riscos aos seus empregados, assim como é de responsabilidade de cada trabalhador a execução de suas tarefas dentro dos parâmetros de segurança, pelo que serão estabelecidas regras genéricas e normas específicas pertinentes. A rotina do Laboratório de Microbiologia envolve riscos relacionados à exposição, tanto com material clínico e reagentes químicos, como com potenciais agentes patogênicos concentrados em meio de cultura. A adoção e prática de normas de segurança e uso de equipamentos afins são considerados imprescindíveis.

(Este item contará com um capítulo especial nas próximas publicações)

1.2.1 Medidas Gerais de Prevenção

Adoção de manuais de procedimentos adequados e de primeiros socorros, acompanhados de treinamento e orientação verbal, sempre que necessário.

- Localização adequada para os equipamentos de segurança em lugar visível, de fácil acesso, incluindo extintores de incêndio, vistoriados regularmente.
- Realização anual de radiografia de tórax para os funcionários que se dedicam à rotina de tuberculose (seguir as orientações do Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar).
- Proibição de fumar, com advertência sobre: aumento do risco de contaminação com microrganismos potencialmente patogênicos ou produtos químicos; risco de incêndio e inconveniência com relação aos colegas de trabalho.
- Recomendação quanto à inconveniência de comer e beber no local de trabalho, devendo haver área destinada para esse fim.
- Recomendação sobre o uso de avental, para proteção da pele e das roupas.
- Recomendações: lavar as mãos freqüentemente; prender os cabelos; não usar anéis e pulseiras; não usar roupa social de mangas compridas; não usar cosméticos gor-durosos.
- Adoção de cuidados especiais na pipetagem e no manuseio de material com-taminado.
- Advertência: as vidrarias contaminadas devem ser colocadas em desinfetante químico (hipoclorito a 1%), imediatamente após o uso, antes de serem lavadas e reutilizadas.
- Rotulação e datação de todos os vidros que contenham reagentes.
- Emprego de autoclave para material clínico, placas e tubos de cultura, antes de serem descartados no lixo hospitalar ou mesmo quando encaminhados para inci-neração.
- Desinfecção, com hipoclorito a 1% ou álcool a 70%, das bancadas e de outras superfícies de trabalho no início e ao final do expediente.
- Utilização de material descartável(seringas, agulhas, luvas, toalhas, etc.).

1.2.2 Cuidados Relativos a Produtos Químicos

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

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

Deve haver no laboratório, à imediata disposição do acidentado, um chuveiro, com grande fluxo de água, e um lavador de olhos. O uso de tais equipamentos pode vir a evitar graves deformações e cegueiras.

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

a) Cuidados Relativos a Produtos Químicos Corrosivos

- Utilizar material descartável (seringas, agulhas ,luvas, toalhas, etc.).
- Manter no laboratório somente o suficiente para o uso. O restante deve ser armazenado em outras salas.
- Transferir materiais de estoque para o laboratório, com bastante cuidado.
- Manter os recipientes de uso em prateleiras localizadas da altura dos olhos para baixo,

- evitando-se riscos de queda e derramamento.
- Nas diluições, nunca se deve juntar água ao ácido concentrado. Sempre adicionar o ácido à água sob resfriamento, de preferência.
- Evitar a respiração junto de vapores de ácidos e evitar contato destes com a pele e com os olhos.
- Não pipetar diretamente com a boca.

b) Cuidados Relativos a Produtos Químicos Tóxicos

- Venenos, como cianetos e barbitúricos, devem ser mantidos trancados em armários.
- Solventes orgânicos (benzeno, tetracloreto de carbono e outros hidrocarbonetos halogenados): técnicas que usam estes solventes devem ser feitas em salas separadas e bem ventiladas ou em capelas de exaustão.
 - Clorofórmio: não inflamável, porém não se deve permitir que seus vapores entrem em contato com fogo ou metais aquecidos, para evitar a formação do gás fosfogênio, que é tóxico.
 - “Éter e acetona: altamente inflamáveis. A conservação implica a aplicação das normas de segurança quanto ao risco de explosão”.
- Gases tóxicos:
 - Monóxido de carbono: concentrações até 1% no ar são perigosas se respiradas por uma hora ou mais. Acima de 1% podem ser fatais.
 - Dióxido de carbono (gelo-seco): concentrações perigosas podem ser atingidas em salas mal ventiladas.

c) Cuidados Relativos a Produtos Químicos Carcinogênicos

Tem sido dispensada atenção cada vez maior a certas aminas aromáticas, compostos azo e nitrosos, entre os quais benzidina e codianisidina, de uso corrente em laboratórios de análises clínicas. Entre as precauções se inclui mantê-los em recipientes bem fechados, rotulados como “carcinogênicos”. Evitar contato com a pele.

1.2.3 Cuidados Relativos aos Riscos de Contaminação

O **Laboratório de Microbiologia** recebe diariamente grande número de amostras de fluidos corporais e outros espécimes clínicos que são, potencialmente, infecciosos. Os maiores perigos estão relacionados com os vírus da hepatite e HIV, bacilos da tuberculose, salmonelas, fungos, protozoários, etc.

É difícil quantificar o risco no trabalho em laboratórios, com relação aos agentes infecciosos. Tem-se por base, porém, que o risco individual aumenta com a frequência e com os níveis de contato com o agente infeccioso. O primeiro cuidado a ser tomado no laboratório que trabalha com espécimes clínicos é com o risco de exposição à infecção. Por outro lado, deve-se considerar que os riscos são influenciados por uma relação variável entre o agente infectante, o hospedeiro e a atividade desempenhada. Fatores aplicáveis ao agente incluem a virulência, a carga infectante, o ciclo e a toxigenicidade. Algumas das principais variáveis que influem no risco do hospedeiro são: idade, sexo, raça, gravidez, uso de antimicrobianos, imunidade (vacinação prévia), e o uso de drogas imunossupressoras. Finalmente, a natureza da atividade laboratorial (por exemplo: diagnóstico, produção, pesquisa) pode afetar significativamente o risco pessoal devido ao tipo, quantidade e concentração dos agentes empregados, a manipulação dos agentes e a eficácia primária e secundária dos equipamentos de proteção e práticas de laboratório.

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

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

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

a) Produção de Aerossóis

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

Exemplos de procedimentos que produzem aerossóis:

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

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

b) Pipetagem de Material Clínico

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

c) Flambagem de Alça Bacteriológica

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

d) Disseminação de Esporos de Fungos

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

1.2.4 Medidas Básicas de Proteção

a) Lavagem das Mãos

Fazendo-se, ou não, uso de luvas, lavar as mãos sempre que houver mudança de atividade, na saída do laboratório e antes de comer, beber e mesmo fumar. A lavagem deve envolver mãos e antebraços, usando-se água e sabão líquido. Friccionar com álcool a 70% contendo 1% a 2% de glicerina. Outra opção é o uso de solução degermante à base de iodeto de polivinilpirrolidona (PVP-I) a 10%. Usar de preferência toalhas descartáveis.

b) Uso de Luvas

O uso de luvas é obrigatório, quando houver possibilidade de contato com sangue e com fluidos corpóreos, especificando-se:

Luva plástica – descartável, deve ser desprezada após cada uso. Indicações: para proteção exclusiva do usuário em situações como colheita de sangue, recebimento ou entrega de material biológico, etc.

Luva doméstica – que pode ser antiderrapante; não descartável. Seu uso é indicado para lavagem e desinfecção de materiais e superfícies. Após o uso, lavar as mãos enluvadas com água e sabão e descontaminar as luvas em solução de hipoclorito a 0,5%, por 30 a 60 minutos.

Luva cirúrgica (látex) – é de preferência descartável, mas pode ser reprocessada, embora com restrições. Indicada para uso em técnicas assépticas (para proteção do paciente e do usuário), tais como cateterização vesical, exames endoscópicos, punção para obtenção de liquor, líquido articular, líquido pleural, etc.

c) Uso de Máscaras, Protetores Oculares e Aventais

Máscaras cirúrgicas e protetores oculares (óculos com proteção lateral) – são utilizados para evitar a exposição das mucosas da boca e dos olhos e impedir o risco de inalação nos procedimentos que possam produzir aerossóis ou causar borrifamento de sangue; também devem ser usadas no manuseio de material biológico.

Aventais – devem ser usados durante os procedimentos acima descritos, no manuseio de culturas microbiológicas e no contato com material orgânico. Os aventais devem ser de mangas longas e, se possível, de tecido sanfonado (tipo avental cirúrgico).

1.2.5 Medidas a Serem Tomadas em Caso de Acidente

De acordo com o Manual de Condutas em Exposição Ocupacional a Material Biológico do Ministério da Saúde, após a exposição ao material biológico, cuidados locais com a área exposta devem ser imediatamente iniciados. Em caso de exposição percutânea, recomenda-se lavagem exaustiva com água e sabão ou solução anti-séptica de degermante (PVP Iodo ou clorexidina). Após a exposição em mucosa, está recomendada a lavagem exaustiva com água ou solução

fisiológica. A indicação do uso de anti-retrovirais deve ser baseada em uma avaliação criteriosa do risco de transmissão do HIV em função do tipo de acidente ocorrido e da toxicidade dessas medicações.

1.2.6 Eliminação de Resíduos, Amostras Clínicas e Material Usado

1.2.6.1 Resíduos químicos tóxicos

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

Dependendo do volume gerado e o tempo de acondicionamento para o tratamento ou disposição final, o laboratório deve também possuir local específico para o abrigo de resíduos, fora da unidade geradora e fora da edificação do estabelecimento.

1.2.6.2 Resíduos Microbiológicos Amostras Clínicas e Material Usado

Todos os materiais empregados no laboratório de microbiologia (meios de cultura inoculados, meios de transporte, espécimes clínicos, swabs empregados na coleta ,etc) devem ser previamente autoclavados antes de serem descartados como resíduo hospitalar.

Os materiais perfuro e cortantes (agulhas, seringas, lancetas e outros assemelhados) devem ser descartados em recipientes estanques, rígidos, com tampa, e identificados com símbolo e expressão de resíduo infectante. As agulhas não devem ser reencapadas ou retiradas manualmente e os recipientes não podem ser esvaziados para reaproveitamento.

1.3 Infra-Estrutura Física

As unidades laboratoriais de microbiologia devem estar em conformidade com a Portaria GM 1.884/94, de 11 de novembro de 1994, do Ministério da Saúde, ou com regulamentação técnica superveniente.

1.4 Recursos Materiais

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

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

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

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

1.5 Recursos Humanos

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

2. Requisição de Exames Microbiológicos e Identificação de Amostras Clínicas

Fatores que podem comprometer o exame microbiológico:

- hipótese diagnóstica mal elaborada, informações mal colhidas, incompletas, ou não, devidamente interpretadas, etc.;
- requisição inadequada da análise laboratorial;
- coleta, conservação e transporte inadequados;
- falhas técnicas no processamento da análise;
- demora na liberação de resultado;
- má interpretação dos resultados.

Deve-se lembrar que o envolvimento do médico com o laboratório de microbiologia pode, com freqüência, ser muito útil para ambos, propiciando melhor orientação técnica, mais objetividade, facilitando a interpretação de resultados, etc. A importância do relacionamento médico com o laboratório deve-se ao fato de que a microbiologia envolve etapas interpretativas para muitos exames, como aqueles que envolvem flora (mucosas), ou no caso de agentes específicos em que são fundamentais a escolha de meios seletivos, uso de meios enriquecedores, a uso de suplementos, ampliação do tempo de cultivo, a variação na temperatura de incubação, a adição de novos testes, etc.

O médico muitas vezes considera um desperdício de tempo o preenchimento de uma requisição de exame microbiológico. Os itens abaixo servem apenas de roteiro para destacar informações que podem ser muito úteis e valorizadas em diferentes etapas do processamento do exame.

2.1 Informações Básicas que Devem Constar da Requisição Médica:

Identificação clara do paciente:

- nome e sobrenome;
- registro no hospital ou serviço;
- data de nascimento (evitar confusão com homônimos e informações importantes relacionadas à faixa etária);
- sexo (por exemplo, a interpretação de bacteriúria pode ser diferente para a mulher);
- clínica, leito ou ambulatório;
- espaço para identificação do exame (número da análise microbiológica e seção do laboratório).

2.2 Informações Relevantes para o Diagnóstico do Processo Infecioso:

Dados gerais sobre o paciente:

- hipótese diagnóstica;
- dados clínicos (descrever objetivamente os achados clínicos mais significativos, lesões cutâneas ou de mucosas, local e características do sítio de infecção, etc.);
- dados epidemiológicos relevantes (viagem ou excursão, se vive em área endêmica de alguma doença infecciosa (malária, riquetsioses, cólera, etc.), doença ocupacional (contato com animais, por exemplo), acidentes (mordida, trauma, picada de carrapato, enchentes, etc.) envolvimento em surto de infecção hospitalar, etc.

- dados laboratoriais que evidenciem o sítio do processo infeccioso (RX, tomografia, urina rotina, hemograma, etc.);
- provável origem do processo infeccioso comunitário ou hospitalar. Se hospitalar: relacionado a procedimento invasivo (sonda vesical, cateter, traqueostomia, diálise, alimentação parenteral, cirurgia);
- existência de infecção em outra topografia? Qual?;
- uso de antibióticos nos últimos dez dias (por quê e quais?);
- paciente com comprometimento imunológico ou com algum fator predisponente à infecção oportunista (prematuridade, transplante de órgãos, uso de droga imunossupressora, diabetes, câncer, aids, leucemia, anemia falciforme, talassemia, hemofilia, esplenectomia, cirrose, etc ? Suspeita de doença oportunista. Qual?;
- paciente transferido ou de alta nos últimos 30 dias de outro hospital? É colonizado ou infectado ou portador de bactérias multirresistentes?
- data do pedido médico, nome legível do médico, carimbo e/ou ramal de contato (facilita a comunicação para situações emergenciais como, por exemplo, isolamento de M.tuberculosis, isolamento de nova cepa multirresistente, etc);
- data e hora da coleta e nome de quem colheu o material (permite reavaliação de procedimentos e reciclagem, por exemplo, quando se detecta excesso de contaminação em uroculturas, etc);
- comentários, quando necessários, sobre o procedimento de coleta. Por exemplo, acidentes ou dificuldades para obtenção do material, condições do paciente, quantidade, etc;
- no caso de suspeita de infecção urinária, informar se o paciente é sintomático ou não.

2.3 Identificação da Amostra

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

Na amostra devem estar identificados:

- nome e registro do paciente;
- leito ou ambulatório e especialidade;
- material colhido;
- data, hora e quem realizou a coleta.

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

2.4 Natureza do Teste Solicitado

Exame microscópico:

- a fresco, campo escuro;
- com coloração Gram, Ziehl, Giemsa, ou outra;
- pesquisa de *Pneumocystis carinii*;
- pesquisa de *Cryptosporidium* e *Isospora belli*.

Cultura:

- rotina bacteriológica;
- rotina para fungos;
- rotina para micobactérias.

Específicos:

- anaeróbios,
- micoplasma,
- Legionella spp,
- Helicobacter spp,
- exames especiais de interesse da CCIH (controle de medicamentos, frascos de soros, bolsas de sangue, portadores, equipamentos, etc.);
- rotina para vírus (quando disponível);
- outros.

Testes especiais:

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

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos:

- rotina(Kirby – Baner)
- antibiograma com drogas não padronizadas;
- outros testes de sensibilidade aos antimicrobianos (Concentração Inibitória Mínima/ CIM, E test);
- pesquisa de antimicrobianos no sangue, LCR, etc., poder bactericida do soro;
- teste de sensibilidade de fungos a drogas, etc.

2.5 Resumo de Itens para Requisição de Análises Microbiológicas (Modelos)

2.5.1 Identificação

Sobrenome e iniciais

Registro n.º

Data de nascimento ____/____/____

Sexo:M () F ()

Clínica () **leito** () **ou ambulatório** ()

Campo para identificação do exame no Laboratório

2.5.2 Informações sobre o Paciente

Hipótese diagnóstica

Dados clínicos

Dados epidemiológicos relevantes

Outros dados laboratoriais importantes

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

Relacionado a procedimento invasivo? Qual?

Cirurgia? Qual?

Existe infecção em outra topografia Qual?

Fez uso nos últimos dez dias de antibióticos? Qual (is)?

Existe comprometimento imunológico? Sim () Não ()

É paciente transferido de outro hospital? Sim () Não ()

É portador de bactérias multirresistentes? Sim () Não ()

Para urocultura informar: sintomático () assintomático () ____/____/____

Data do pedido

legível do médico/CRM, carimbo e/ou telefone de contato

____/____/____

Data e hora da coleta

identificação de quem colheu o material

Nome

Nome e

2.5.3 Descrição da amostra

Hemocultura: Sangue periférico () Sangue colhido de cateter ()

Urocultura: Jato médio () Sonda de alívio () Sonda vesical de demora () Punção suprapúbica () Saco coletor ()

Trato Respiratório: Orofaringe () Escarro () Aspirado Traqueal () Lavado bronco-alveolar ()

Escovado brônquico, etc. ()

Lesões, secreções, abscessos ()

Descrever: Topografia, nível da coleta (superficial ou profunda) e via de obtenção do material: Punção, swab, raspado, drenagem ou fístula, dreno, etc.

Líquidos cavitários: Líquor () líquido pleural () pericárdico () sinovial () ascítico ()

Próteses () pontas de cateter ()

Outros:

2.5.4 Natureza do Teste Solicitado:

Exame microscópico:

Direto ()

Gram ()

Ziehl ()

Outro:

Cultura:

Rotina bacteriológica ()

Rotina para fungos ()

Rotina para micobactérias ()

Rotina para anaeróbios ()

Rotina para vírus ()

Outros testes (em geral realizados sob consulta).

3 Coleta Microbiológica

3.1 Considerações Gerais

Todo **resultado** liberado pelo laboratório de microbiologia é conseqüência da **qualidade da amostra recebida**.

O material colhido deve ser representativo do processo infeccioso investigado, devendo ser eleito o melhor sítio da lesão, evitando contaminação com as áreas adjacentes.

A coleta e o transporte inadequados podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o desenvolvimento da flora contaminante, induzindo a um tratamento não apropriado.

Portanto, procedimentos adequados de coleta devem ser adotados para evitar o isolamento de um “falso” agente etiológico, resultando numa orientação terapêutica inadequada.

- Colher **antes da antibioticoterapia**, sempre que possível.
- Instruir claramente o paciente sobre o procedimento.
- Observar a anti-sepsia na coleta de todos os materiais clínicos.
- Colher do **local** onde o microrganismo suspeito tenha maior probabilidade de ser isolado.
- Considerar o estágio da doença na **escolha do material**. Patógenos entéricos, causadores de diarreia, estão presentes em maior quantidade e são mais facilmente isolados durante a fase aguda ou diarreica do processo infeccioso intestinal. Na suspeita de febre tifóide, a fase da doença irá determinar o melhor local da coleta (sangue/fezes).
- Quantidade suficiente de material deve ser coletado para permitir uma completa análise microbiológica. Caso a quantidade seja pequena, priorizar os exames.
- O pedido do exame deve conter, além da identificação do paciente, dados como idade, doença de base e indicação do uso de antibióticos.

3.2 Considerações de Segurança

- Utilizar as barreiras de proteção necessárias a cada procedimento.
- Toda amostra deve ser tratada como potencialmente patogênica.
- Usar frascos e meios de transporte apropriados.
- Não manusear a amostra em trânsito: paciente e laboratório.
- Não contaminar a superfície externa do frasco de coleta e verificar se ele está firmemente vedado. Caso ocorram respingos ou contaminação na parte externa do frasco, fazer descontaminação com álcool 70% ou outra solução descontaminante disponível.
- Não contaminar a requisição médica que acompanha o material.
- As amostras deverão ser transportadas em sacos plásticos fechados.
- Identificar claramente a amostra coletada, com todos os dados necessários.
- Colocar a identificação no frasco de coleta e nunca na tampa ou sobre rótulos.
- Encaminhar os materiais imediatamente ao laboratório.

3.3 Critérios de Rejeição para Amostras Clínicas Enviadas ao Laboratório de Microbiologia

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

3.3.1 Principais Erros de Identificação

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

3.3.2 Amostras Inadequadas

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

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

Amostras não Recomendadas para o Exame Microbiológico por Fornecerem Resultados Questionáveis

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

3.4 Transporte das Amostras

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

- assegurar a sobrevivência e isolamento do microrganismo, pois o laboratório de microbiologia trabalha basicamente em função da viabilidade dos microrganismos;
- evitar o contato prolongado dos microrganismos com anestésicos utilizados durante a coleta, pois eles poderão exercer atividade bactericida;
- evitar erros de interpretação nas culturas quantitativas, principalmente urina e lavado broncoalveolar.

Consultar o laboratório para verificar a disponibilidade dos meios de transporte.

Tempo Crítico para Entrega da Amostra ao Laboratório e Meios de Transporte

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

3.5 Instruções de Coleta

3.5.1 Hemoculturas

a) Técnicas de Coleta

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

Observações:

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

Fatores que influenciam diretamente os resultados de hemoculturas:

- 1 Volume de sangue coletado por frasco.

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

O anticoagulante recomendado é o SPS (Polianetolsulfonato sódico).

2 Método de anti-sepsia.

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

b) Identificação dos Frascos e Pedido Médico

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

c) Transporte

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

d) Número de Frascos

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

A. Adultos e Adolescentes

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

B. Crianças

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

3.5.2 Ponta de Cateter Intravascular

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

Técnicas de Retirada da Ponta de Cateter:

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

- Fazer uma rigorosa anti-sepsia da pele ao redor do cateter com álcool 70%, seguida de uma solução de iodo (tintura de iodo 1% a 2% ou PVPI 10%, que deverá ser removida com álcool 70% para evitar queimadura pelo iodo ou reação alérgica.
- Remover o cateter e, assepticamente, cortar 5 cm da parte mais distal, ou seja, a que estava mais profundamente introduzida na pele. Não usar tesouras embebidas em soluções anti-sépticas.
- Colocar o pedaço do cateter num frasco estéril, sem meio de cultura. O material deve ser transportado imediatamente ao laboratório evitando sua excessiva secagem.

A presença de um número maior ou igual a 15 colônias de um único tipo de bactéria sugere que a ponta de cateter pode estar sendo fonte de infecção (Maki).

Cateteres aceitáveis para cultura semiquantitativa: Central, CVP, Hickman, Broviac, periférico, arterial, umbilical, alimentação parenteral e Swan-Ganz.

3.5.3 Ponta de Sonda Vesical

Não realizar cultura de ponta de sonda vesical, porque o crescimento bacteriano representa a flora da uretra distal.

Recomenda-se cultura de urina após 48 horas da retirada da sonda na monitorização de processos infecciosos.

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

3.5.4 Escarro

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

Lembrar que este material não é considerado ideal para avaliação microbiológica do trato

respiratório. Hemocultura, lavado brônquico ou aspirado transtraqueal podem fornecer resultados mais confiáveis.

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

3.5.5 Secreção Traqueal

A coleta deste material é realizada em pacientes entubados, através de sonda de aspiração.

Os resultados microbiológicos dessas amostras podem refletir colonização local, sendo a interpretação clínica extremamente complicada.

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

3.5.6 Aspirado Transtraquial (ATT)

Procedimento realizado por equipe médica especializada.

O material é obtido diretamente por material transtraqueal, evitando-se contaminação com o trato respiratório alto.

3.5.7 Lavado Bronco-Alveolar (BAL)

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

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

O tempo do transporte da amostra é essencial, devendo estar em torno de 30 minutos, sendo o máximo aceitável de 1 a 2 horas.

O material deverá ser obtido antes das biópsias de escovados para se evitar excesso de sangue.

Este procedimento deve ser realizado por equipe médica especializada.

Colher as alíquotas em recipientes distintos:

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

Cultura para anaeróbios do trato respiratório:

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

3.5.8 Secreção de Orofaringe

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

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

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

- Enviar imediatamente ao laboratório para evitar a excessiva secagem do material.

3.5.9 Fluidos Orgânicos Estéreis

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

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

a) Liquor

- Procedimento realizado por equipe médica especializada.
- Recomenda-se jejum

Caso a coleta permita somente a disponibilidade de um tubo, o laboratório de microbiologia deverá ser o primeiro a manipulá-lo. Caso haja coleta de dois ou mais tubos, o Laboratório de Microbiologia deverá ficar com o tubo que contiver menos sangue.

- Ao transportar a amostra, nunca refrigerar.

Transportar a amostra imediatamente ao laboratório, acompanhada de pedido médico, adequadamente preenchido, nos casos de paciente com idade crítica. Os exames a serem realizados devem ser especificados e priorizados de acordo com o volume coletado.

3.5.10 Feridas, Abscessos e Exsudatos

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

- a) As margens e superfície da lesão devem ser descontaminadas com solução de povidine-iodine (PVPI) e soro fisiológico (metade/metade).
- b) Proceder à limpeza com solução fisiológica.
- c) Coletar o material purulento localizado na parte mais profunda da ferida, utilizando-se, de preferência, aspirado com seringa e agulha. Quando a punção com agulha não for possível, aspirar o material somente com seringa tipo insulina.
- d) Swabs (menos recomendados) serão utilizados quando os procedimentos acima citados não forem possíveis.

A escarificação das bordas após anti-sepsia pode produzir material seroso que é adequado para cultura.

Observações:

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

Cultura para anaeróbios de secreções de feridas e abscessos:

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

3.5.11 Amostras de Tecidos

a) Tecido Subcutâneo e Amostras de Pele

A superfície da ferida de queimadura estará colonizada pela microbiota do próprio paciente e/ou pelos microrganismos do meio ambiente em que se encontra. Quando a colonização de bactérias for grande, pode ocorrer infecção subcutânea, resultando numa bacteremia. Cultura somente da superfície pode levar a erros e é desaconselhável. Portanto, biópsia de tecido profundo é o mais indicado. Os microrganismos não ficam distribuídos somente na ferida queimada. Por isso, recomenda-se coletar amostras de áreas adjacentes da queimadura.

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

Considerações para Coleta de Tecido Subcutâneo e Amostras de Tecido

Cultura	Comentário
BACTÉRIA ANAERÓBIO	Aspirado ou amostra de biópsia são preferíveis ao invés de swab. Não é comum para queimaduras, úlceras, nódulos ou infecções superficiais da pele; usado para mordeduras e traumas.
FUNGO dimórficos.	Usada para diagnosticar dermatófitos, leveduras, filamentos e fungos
MICOBACTÉRIA	Útil no diagnóstico de <i>M. marinum</i> , <i>M. fortuitum</i> e <i>M. chelonae</i> .

b) Biópsia da Pele

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

c) Tecido Ósseo

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

Lesões Superficiais - Coleta Para Fungos - Micológico Direto

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

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

3.5.12 Secreção de Ouvido

- Conduto auditivo externo e médio (até a membrana timpânica).
- remover secreção superficial com um swab umedecido em salina estéril e obter material com outro swab fazendo rotação no canal e em seguida inserir no meio de transporte (Stuart).
- Conduto auditivo interno
 - a) membrana timpânica rompida: o médico deve proceder como no item anterior e com espéculo ou cone de otoscópio coletar material com swab e em seguida inserir no meio de transporte. Com outro swab, fazer esfregaço para coloração Gram.
 - b) membrana íntegra: usar seringa para puncionar a membrana ou sistema apropriado para aspiração e coletor, que deverão ser encaminhados imediatamente ao laboratório para processamento ou introduzir em meio de transporte para conservação e fazer lâmina para bacterioscopia.

3.5.13 Secreção Ocular

As culturas deverão ser coletadas antes da aplicação de antibióticos, soluções, colírios ou outros medicamentos.

- Desprezar a secreção purulenta superficial e, com swab, colher o material da parte interna da pálpebra inferior.
- Identificar corretamente a amostra e enviar imediatamente ao laboratório, evitando a excessiva secagem do material.

3.5.13 Material Genital

Amostras e Sítios Genitais para Cultura

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

a) Considerações Gerais

- A seleção de materiais genitais, bem como sua coleta adequada, são fatores importantes na interpretação das culturas deste tipo de material, uma vez que estes possuem uma quantidade grande de microrganismos comensais.
- Culturas vaginais de rotina não são indicadas pelo motivo acima exposto.
- Culturas anaeróbias são limitadas a certos materiais, conforme tabela anterior.
- Muitos agentes de infecção genital em mulheres são limitados a certos sítios anatômicos, conforme tabela a seguir.
- Nos casos de suspeita de infecção por *Chlamydia trachomatis* deverá ser solicitado exame por imunofluorescência ou por biologia molecular (PCR). Pode ocorrer associação entre infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.
- Material purulento, proveniente da glândula de Bartholin, poderá ser obtido diretamente do ducto, após massagem digital ou colhida através de seringa.
- Endométrio: este tipo de material é melhor coletado por curetagem. Recomenda-se o uso de swabs protegidos para coleta via cérvix, para evitar contaminação com a flora vaginal.
- DIP (Doença Inflamatória Pélvica): o material é coletado por técnica invasiva. Líquido peritoneal pode ser coletado por aspiração do fundo de saco vaginal (culdocentese). Material retirado diretamente dos ovários ou trompas são coletados cirurgicamente.
- Vulva: raspados, aspirados ou biópsia não têm muito valor para cultura a não ser em casos de suspeita de sífilis. Nos casos de suspeita de sífilis, a lesão deverá sofrer uma abrasão cuidadosa com gaze seca até que um fluido seroso comece a fluir, tomando cuidado para evitar sangramento, o que acarreta interferência no exame em campo escuro. Após o

- acúmulo de fluido seroso, colocar uma gota em uma lâmina limpa e examinar imediatamente.
- DIU (Dispositivo Intra-Uterino): deve ser removido pelo médico evitando-se contaminação cervical ou vaginal. Coloque todo o DIU dentro de um recipiente estéril para ser transportado para o laboratório.
- Cultura semi-quantitativa para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* podem ser realizadas com kits comercializados. Consultar a bula para maiores informações. Infecções por *Chlamydia trachomatis*: não aceitar secreção vaginal para pesquisa de *Chlamydia*, uma vez que este microrganismo não pode crescer nas células epiteliais escamosas da vagina. *Chlamydia* são parasitas intracelulares obrigatórios do epitélio colunar do cérvix. Realizar coleta de material endocervical, raspando-se o endocérvix para obter células e secreção. O swab deverá ser inoculado imediatamente em meio de transporte especial ou preparar as lâminas para coloração especial.
- Detecção de estreptococos do grupo “B” em mulheres: culturas cervicais não são aceitáveis e não se devem utilizar espéculos. Sugere-se coleta com swab do intróito vaginal e outro do orifício anorretal. Os swabs devem ser colocados em meios de transporte.
- Secreção prostática: poderá ser coletada após massagem digital pelo reto, podendo ser acompanhada de amostras de urina pré e pós-massagem. O material ejaculado também poderá ser submetido à análise.
- Na suspeita de *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres, a cultura é o método de escolha, sendo o material coletado do endocérvix. O encaminhamento deve ser feito em meio de transporte ou plaqueado imediatamente.

b) Secreção Cervical e Vaginal
Considerações para Coleta de Exames Microbiológicos

Amostra a ser coletada Exames realizados Material necessário para coleta

SECREÇÃO VAGINAL Bacterioscopia Swab seco para duas lâminas

Cultura para fungo/aeróbio Swab com meio de transporte

SECREÇÃO ENDOCERVICAL Bacterioscopia Swab seco para duas lâminas

Cultura para micoplasma e ureaplasma Meio de transporte específico

PCR para *Chlamydia* Meio de transporte específico

PCR para HPV Meio de transporte específico

c) Preparo da Paciente

Recomenda-se:

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

d) Coleta Vaginal

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

- Swab do meio de transporte para cultura aeróbia/fungos.

e) Coleta Endocervical

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

Cultura para anaeróbios do trato genital feminino

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

f) Secreção Uretral

Da rapidez na entrega da amostra ao laboratório depende o sucesso da cultura.

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

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

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

3.5.15 Secreção Anal

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

Considerações para Coleta de Secreções do Trato Ano-Genital

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

3.5.16 Fezes

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

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

a) Swab Retal

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

3.5.17 Urina

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

Crianças

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

Modo de colheita:

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

Adultos (sexo feminino)

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

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

- **Adultos (sexo masculino)**

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

Pacientes cateterizados com sistema de drenagem fechada

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

Observação:

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

3.6 Anaeróbios

3.6.1 Princípio

Anaeróbios podem estar envolvidos em infecções nas mais diversas partes do organismo humano. A coleta deve ser feita evitando-se contaminação com a flora normal endógena. Na solicitação médica deve constar também cultura para germes aeróbios.

A boa comunicação entre o corpo clínico e o laboratório com o fornecimento de informações como impressão clínica, estado do paciente ou suspeita de organismo incomum assegura o sucesso da cultura anaeróbia.

3.6.2 Coleta da Amostra

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

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

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

Avaliação das Amostras para Cultura de Anaeróbios

Sítio	Amostra Aceitável	Amostra Inaceitável
CABEÇA E PESCOÇO	abscesso coletado com agulha e seringa após descontaminação da superfície. Material de biópsia coletado por cirurgia. Swab obtido por cirurgia quando for impraticável a aspiração. orofaringe e nasofaringe. Swab gengival. Material superficial coletado com swab.	Aspirado do
PULMÃO	transtraqueal. Material obtido de punção pulmonar percutânea. Material de biópsia obtido cirurgicamente. Amostra broncoscópica obtida com cateter “double-lumen” evitando contaminação. expectorado. Escarro induzido. Aspirado endotraqueal. Material broncoscópico não coletado adequadamente.	Aspirado Escarro
SNC	Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa. Material de biópsia obtido por cirurgia.	Liquor. Swab aeróbio.
ABDÔMEN	peritoneal obtido com agulha e seringa. Aspirado de abscesso obtido com agulha e seringa. Bile. Material de biópsia obtido por cirurgia.	Fluido Swab aeróbio.
TRATO URINÁRIO	suprapúbico. Urina de cateter.	Aspirado Urina.
TRATO GENITAL FEMININO	laparoscopia. Aspirado endometrial obtido por sucção ou cureta-gem após descontaminação. Material de biópsia obtido por cirurgia. DIU (Dispositivo intra-uterino), somente para Acti-nomyces sp.	Material de Swab vaginal ou cervical.
OSSOS E ARTICULAÇÕES	obtido com agulha e seringa. Material de biópsia obtido por cirurgia. com swab.	Aspirado Material de superfície cole-tado
TECIDOS MOLES	obtido com agulha e seringa. Material de biópsia obtido por cirurgia. Aspirado do trato sinusal obtido com cateter plás-tico. Aspirado profundo de ferida aberta obtido após descontaminação da pele.	Aspirado Material de

superfície cole-tado da pele ou bordos da ferida.

Material coletado com swab.

ESTÔMAGO

E INTESTINO

DELGADO Somente na Síndrome de Alça Cega ou Síndrome de Má Absorção.

INTESTINO

GROSSO Somente para cultura ou pesquisa de toxinas quando houver suspeita de *C. difficile* ou *C. botulinum*.

3.6.3 Transporte da Amostra

- O material aspirado deve ser precedido da eliminação do ar residual.
- Transportar em frascos e meios apropriados visando ao isolamento de bactérias anaeróbias.

Tempo de Transporte x Volume de Amostra e/ou Método Coletado

Amostra

Tempo ótimo para transporte ao laboratório

Aspirados:

- inferior a 1ml

- superior a 1ml

15 minutos – temperatura ambiente.

30 minutos – temperatura ambiente.

Meio de transporte anaeróbio. 2 horas – temperatura ambiente.

Tecido ou material de biópsia:

- recipiente estéril.

- meio de transporte ou bolsa anaeróbia.

30 minutos – temperatura ambiente.

2 horas – temperatura ambiente.

Swabs anaeróbios:

- em tubo com atmosfera anaeróbia.

- em meio de transporte anaeróbio.

1 hora – temperatura ambiente.

2 horas - temperatura ambiente.

4 Exames Microscópicos e Coloração

4.1 Direto sem Coloração

4.1.1 Salina

Material: salina (soro fisiológico - 0,85% de cloreto de sódio), lâmina e lamínula.

Indicação: permite observar a morfologia bacteriana e avaliar a existência de motilidade. Usada para pesquisa a fresco de *Trichomonas* em secreções, fungos (leveduri-formes ou filamentosos) e em diferentes materiais, etc.

Técnica: gotear a salina (uma gota) no centro de uma lâmina de microscopia e nela suspender uma colônia ou uma alçada do material a ser investigado.

Cobrir com uma lamínula e examinar ao microscópio, com objetiva de 40X ou 100X (óleo de imersão).

4.1.2 Hidróxido de Potássio

Material: hidróxido de potássio em solução aquosa a 10% ou 20%, lâmina e lamínula.

Indicação: usado para pesquisa de fungos (leveduriformes e particularmente filamentosos) em material biológico na presença de muco, restos celulares, pêlos, unhas, etc., por facilitar a microscopia, dissolvendo a queratina e o muco, destacando as estruturas fúngicas, quando presentes.

Técnica: colocar uma pequena amostra do material a ser pesquisado no centro da lâmina; suspender o material com uma a duas gotas de KOH; cobrir com lamínula e aguardar 30 minutos ou aquecer ligeiramente a lâmina para acelerar o clareamento; examinar com objetiva de 10X ou 40X, fechando o diafragma.

As lâminas poderão ser colocadas em câmara úmida e, após 24 horas, realizar uma segunda leitura microscópica.

4.1.3 Exame em Campo Escuro

Material: microscópio com condensador de campo escuro e, quando possível, objetiva de 100X com íris, lâmina, lamínula, salina e óleo de imersão.

Indicação: empregado para observar a motilidade de bactérias dificilmente observadas em microscopia direta com salina, como é o caso do *Treponema pallidum* e da *Leptospira* sp., podendo ser usada também para observar a motilidade do *Campylobacter* sp. e outras bactérias.

Técnicas:

- Para a pesquisa do *Treponema pallidum* devem-se atritar as bordas da lesão suspeita com um swab ou alça bacteriológica. Colher o exsudato com a própria alça ou fazer um imprint com a lâmina e cobrir com a lamínula (utilizar uma gota de salina). Realizar a pesquisa rapidamente.
- Para a pesquisa de *Leptospira* um dos materiais mais utilizados é a urina recém-emitida, centrifugada e examinado o sedimento. A microscopia em campo escuro é realizada colocando-se óleo de imersão entre o condensador e a parte inferior da lâmina (deve-se encostar o condensador na lâmina). Inicialmente, observa-se com objetiva de 40X para obter o foco e avaliar as condições do material, fazendo-se, a seguir, a bacterioscopia por imersão, com objetiva de 100X.

4.1.4 Tinta da China (nanquim)

Material: tinta da China (nanquim), lâmina e lamínula.

Indicação: a principal indicação é para pesquisa de criptococos em liquor ou outros materiais, permitindo destacar a cápsula deste fungo contra um fundo negro.

Técnica: o sedimento do liquor ou uma colônia do meio de cultura é suspensa em uma gota de tinta da China, fazendo-se um filme bem delgado entre a lâmina e a lamínula e observando-se com objetivas de 10X e 40X. Caso esteja muito espesso, pode-se adicionar uma pequena gota de salina esterilizada na suspensão, para facilitar a observação. **Erro comum:** confundir linfócitos com criptococos. A diferenciação é feita através da observação do núcleo refringente e gemulação do fungo.

4.2 Coloração de GRAM

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

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

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

Utilidade da coloração de Gram: rapidez na informação e orientação na terapia empírica, avaliação da qualidade do material colhido, sugerindo o tipo de cultura - rotina ou especial.

4.2.1 Equipamentos e Materiais Necessários

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

Nota:

1. Os materiais citados acima são opcionais, dependendo da amostra clínica coletada e da rotina laboratorial.
2. Observar normas de biossegurança.

4.2.2 Utilização

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

4.2.3 Esfregaços

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

A. Material Clínico

A.1. Amostra coletada com swab

Rodar o swab suavemente pela lâmina limpa, evitando a destruição dos elementos celulares e dos grupamentos.

Quando somente um swab for coletado, colocá-lo em um tubo estéril contendo uma pequena quantidade de salina estéril (0,4 ml) e agitar (vortex). Comprimir o swab contra as paredes do tubo e utilizá-lo para fazer o esfregaço. O restante do material pode ser inoculado nos meios de cultura.

Nota:

1. Materiais clínicos coletados com swab são menos recomendados para cultura.
2. Coletar, sempre que possível, dois swabs: um será utilizado para fazer o esfregaço e o outro para cultura.

A.2. Aspirados, exsudatos, etc.

Materiais recebidos em seringas serão transferidos para um tubo estéril e agitados (vortex), quando necessário.

Selecionar a porção mais purulenta ou mucosa com pipeta ou alça bacteriológica. Amostras muito espessas ou purulentas podem ser diluídas com uma gota de salina estéril e espalhadas sobre uma grande área da lâmina formando um esfregaço delgado.

A.3. Escarro

Com auxílio de alça bacteriológica ou um palito de madeira, “pescar” uma porção purulenta do escarro que seja representativa. Rolar esta porção na parede do frasco para separar do material salivar. Em seguida, colocar o material na extremidade de uma lâmina limpa, confeccionando um esfregaço delgado.

Quando a quantidade de saliva for grande e pequenas porções purulentas forem visíveis, transferir a amostra para uma placa de Petri para facilitar a retirada do material representativo.

A.4. Líquor ou outros fluidos orgânicos

Alguns laboratórios utilizam a citocentrífuga (cytospin) para concentrar os líquidos orgânicos e fazer os esfregaços. Este método tem sido utilizado para aumentar a sensibilidade da coloração de Gram, diminuir o tempo de centrifugação e agilizar o resultado.

Materiais aparentemente límpidos devem ser previamente centrifugados a 2.000-5.000 rpm/15 minutos e o esfregaço feito a partir do sedimento.

Após a centrifugação, remover o sobrenadante com uma pipeta estéril, deixando, aproximadamente, 0,5 ml de sedimento. Colocar uma gota do sedimento numa lâmina limpa, sem espalhar. Deixar secar. Para aumentar a concentração do fluido a ser examinado, adicionar uma segunda gota na mesma área da lâmina, anteriormente utilizada.

A.5. Urina jato médio

Homogeneizar bem o material e utilizar uma gota da amostra, sem centrifugação.

A.6. Biópsias ou fragmentos de tecido

Colocar o material em uma placa de Petri estéril e triturar com auxílio de um bisturi.

Preparar os esfregaços fazendo vários imprints numa lâmina limpa, de preferência, estéril.

B. Cultura em caldo

Transferir uma a duas gotas para uma lâmina limpa utilizando alça bacteriológica ou pipeta.

Espalhar suavemente o material a fim de obter um esfregaço delgado.

C. Colônias obtidas de meio sólido

Utilizar uma gota de salina estéril em uma lâmina limpa.

Transferir uma pequena porção da colônia com alça bacteriológica.

Misturar suavemente para obter um esfregaço levemente turvo e homogêneo.

Nota:

Para evitar a formação de aerossóis, nunca misturar o material vigorosamente.

4.2.4 Fixação do Esfregaço

- Calor

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

- Metanol ou Etanol

A fixação pelo metanol ou etanol também pode ser utilizada. Além de prevenir a lise das hemácias, evita que os esfregaços, principalmente os de urina, desprendam-se no momento da coloração.

Deixar o esfregaço secar numa superfície plana; após, colocar uma a duas gotas de álcool (1 min), drenando o excesso, sem lavar. Não aquecer a lâmina antes da coloração.

4.2.5 Preparo do reagente para a coloração de GRAM (modificado por Hucker)

Cristal-violeta - solução estoque
Solução A - Cristal-violeta

40 g

Álcool etílico a 95% 400 ml

Solução B - Oxalato de amônio 16 g

Água destilada 1600 ml

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

Cristal-violeta - solução de uso

Solução A 40 ml

Solução B 160 ml

Misturar as duas soluções, deixar em repouso e filtrar após 24 horas.

Lugol (mordente)

Iodo metálico 1 g

Iodeto de potássio 2 g

Água destilada 300 ml

Validade: seis meses em temperatura ambiente

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

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

Descolorantes

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

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

Precauções: etanol e acetona são inflamáveis.

Contracorante

Solução de reserva:

safranina 5 g

álcool etílico a 95% 500 ml

Solução de trabalho:

solução de reserva 10 ml

água reagente 90 ml

Validade: um ano em temperatura ambiente ou fucsina básica a 0,1% ou 0,2% em água reagente. Misturar suavemente até a dissolução.

Validade: seis meses em temperatura ambiente – frasco de âmbar.

4.2.6 Coloração

- a) Cobrir a área com a solução de cristal-violeta por cerca de um minuto.
- b) Decantar o cristal-violeta e lavar suavemente com a própria solução de iodo ou água da torneira.

Nota:

Lavagem excessiva nesta etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas.

- c) Cobrir a área do esfregaço com a solução de iodo durante cerca de um minuto.
- d) Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona (1:1), até que o solvente escorra incolor. Alternar com água corrente (jato fraco). O tempo usualmente utilizado nesta etapa é de cerca de 10 segundos.

Nota:

Lavagem excessiva nesta etapa pode causar a retirada do cristal violeta das células Gram-positivas, assim como, a pouca descoloração pode resultar em pouca retirada do cristal violeta, ocasionando uma tonalidade azulada nas bactérias Gram-negativas.

- e) Cobrir o esfregaço com a solução de safranina (ou Fucsina básica 0.1% a 0.2%), por, cerca de 30 segundos
- f) Lavar com água corrente.
- g) Deixar secar ao ar, em temperatura branda (50°C).

4.2.7 Como Reportar os Resultados

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

4.2.8 Leitura do Gram

Utilizando a objetiva de menor aumento (10X), fazer uma análise do esfregaço como um todo, avaliando:

- a qualidade da coloração e a espessura do esfregaço;
- se o material clínico coletado é apropriado para cultura, observando a quantidade relativa de leucócitos, hemácias, células epiteliais;
- a presença de bactérias pertencentes a microbiota normal, indicando uma coleta inadequada da amostra clínica;
- localização e agrupamento bacteriano;
- filamentos, pseudo-hifas e leveduras.

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

Sistema de Quantificação

Células e Polimorfonucleares (PMN)

Média em 10 campos (10X de aumento) Microrganismos

Média em 15 a 20 campos (100 X aumento)

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

4.2.9 Causas Comuns de Erro

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

4.2.10 Controle de Qualidade

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

4.3 Outras Colorações

4.3.1 Albert Layborn (Corinebactérias)

Solução A

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

Solução B

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

Execução:

- corar três minutos com solução A;
- escorrer e, lavar com água corrente, cobrir com solução B;
- após dois minutos, lavar com água corrente rapidamente;
- enxugar com papel de filtro e secar sem passar na chama.

Observar o corpo bacteriano corado em verde e os grânulos metacromáticos (castanho- escuro).

4.3.2 Coloração de Flagelos

Impregnação pelo método de Rhodes (Suassuna & Suassuna, 1972)

a) Mordente

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

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

b) Nitrato de prata amoniacal

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

Execução:

- preparar esfregaço;
- filtrar o mordente sobre o esfregaço e deixar três a cinco minutos;
- lavar abundantemente com água;
- cobrir com o nitrato de prata amoniacal e aquecer suavemente até a emissão de vapores, por três a cinco minutos.

Resultado:

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

4.3.3 Coloração de ZIEHL-NEELSEN

a) Solução de carbolfucsina

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

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

b) Ácido-álcool

Álcool etílico.....	97 ml
Ácido clorídrico concentrado.....	3 ml

c) Coloração de fundo (azul-de-metileno)

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

Execução:

- Cobrir a superfície da lâmina com a solução de carbolfucsina.
- Aquecer a lâmina coberta com o corante, lentamente com auxílio de um bico de Bunsen, até a emissão de vapores, tomando o cuidado para não deixar ferver. Aquecer com calor baixo ou intermitente por um período de três a cinco minutos .

- Deixar a lâmina esfriar.
- Lavar a lâmina com água corrente.
- Cobrir a lâmina com solução de álcool - ácido a 3% e descorar o esfregaço até que o corante não drene mais da lâmina.
- Lavar a lâmina com água corrente e esgotando todo resíduo da mesma.
- Cobrir a lâmina com o corante de contraste (azul de metileno), por 20 a 30 segundos.
- Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar naturalmente sem forçar com papel de filtro.
- Examinar o esfregaço com objetiva de imersão no aumento de 100x.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 - BALLOWS, A. J., W. J. HAUSLER, K. L. HERRMANN, H. D. ISENBERG, H. J. SHADOMY. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
- 2 - BARON, F. J., and S. M. FINEGOLD. Diagnostic Microbiology, 8th h ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1990.
- 3 - BARTLETT, J. G., K. J. RUAN, T. F. SMITH, and W. R. WILSON. Cumitech 7A, Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections. Coordinating ed., J.A. Washington II. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
- 4 - CLARRIDGE, J. E., M. T. PEZZLO, and K. L. VOSTI. Cumitech 2A, Laboratory Diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987.
- 5 - CLINICAL LABORATORY TECHNICAL PROCEDURE MANUALS - 2th Edition; Approved

Guideline. NCCLS document GP2-A2 (ISBN 1-56238-156-3) NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085, 1992.

- 6 - FORBES, B. A., D. F. SAHM, and A. S. WEISSFELD. BAILEY & SCOTT'S Diagnostic Microbiology
- 7 - GILLIGAN, P. H., J. M. JANDA, M. A. KARMALI, and J. M. MILLER. Cumitech 12A Laboratory Diagnosis of Bacterial Diarrhea. Coordinating ed., F.S. Nolte. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
- 8 - ISENBERG, H. D., F. D. SCHOENKNECHT, and A. VON. G. CUMITECH 9, Collection and Processing of Bacteriological Specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1979.
- 9 - ISENBERG, H. D., Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
- 10 - ISENBERG, H. D. Essential procedures for Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
- 11 - KONEMAN, E. W. et al. Color Atlas Textbook of Diagnostic Microbiology. 5. Ed Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1997
- 12 - MILLER, J. M. A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1996.
- 13 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle da infecção hospitalar. Brasília, 1991.
- 14 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. Manual de condutas em exposição ocupacional a material biológico. Brasília, 1999.
- 15 - MURRAY, P. R., E. J. BARON, M. A. PFALLER, F. C. TENOVER, R. H. YOLKEN. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1995.
- 16 - RELLER, L. B., P. R. MURRAY, and J. D. MACLOWRY. Cumitech 1A. Blood Cultures II. Coordinating ed., J.A. Washington II. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982.
- 17 - RODLOFF, A. C., P. C. APPELBAUM, and R. F. ZABRANSKY. Cumitech 5A, Practical Anaerobic Bacteriology. Coordinating ed., A.C. Rodloff. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
- 18 - Portaria GM 1.884/94 –DOU de 11 de novembro de 1994.

Equipe de elaboração

Carlos Emílio Levy - Médico Microbiologista Clínico
Cássia Maria Zoccoli - Farmacêutica Bioquímica
Elsa Masae Mamizuka - Farmacêutica Bioquímica
Flávia Rossi - Médica Microbiologista Clínica

Copidesque: Waldir Rodrigues Pereira

Digitação: José Armando Costa Cunha

Projeto gráfico: Sergio Lima Ferreira

Revisão: Mara Pamplona

Apoio Técnico da Unidade de Controle de Infecção em Serviços de Saúde –GGTSS/ANVISA

Eni Rosa Aires Borba Mesiano – Enfermeira

Glória Maria Andrade – Médica

Lucila Pedroso da Cruz – Gerente Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde

Cláudio Maierovitch Peçanha Henriques – Diretor Adjunto da Agência Nacional de Vigilância Sanitária