

Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica

Módulo V

ÍNDICE

1. Estafilococos, estreptococos, enterococos e outros cocos gram positivos	1
Introdução.....	1
Identificação preliminar.....	1
Identificação de estafilococos.....	3
Identificação dos staphylococcus aureus.....	4
Identificação dos estreptococos.....	5
2. Neisserias	9
Introdução.....	9
Isolamento	10
Transporte e semeadura do material.....	11
Bacterioscopia e identificação.....	11
3. Enterobactérias	14
introdução	14
tipos de testes utilizados para identificação.....	15
etapas da identificação de enterobactérias.....	18
identificação das enterobactérias de importância clínica	19
identificação sorológica	27
4. Bastonetes não fermentadores	31
Introdução.....	31
Semeadura, leitura e interpretação das provas de identificação	31
Procedimentos para a identificação	33
5. Bacilos curvos ou espiralados	41
Introdução.....	41
<i>Campylobacter</i>	42
<i>Vibrios, Aeromonas e Plesiomonas</i>	43
6. Bacilos gram positivos	45
Introdução.....	45
Corineformes	46
Bacilos gram positivo	50
Bacilos esporulados aeróbios e anaeróbios facultativos.....	52
Actinomicetos	54
7. Fastidiosos	56
Introdução.....	56
<i>Bartonella</i>	58
<i>Bordetella</i>	59
<i>Brucella</i>	60
<i>Francisella tularensis</i>	61
<i>Haemophilus</i>	62
<i>Legionella</i>	64
<i>Pasteurella</i>	65
<i>Actinobacillus</i>	66
<i>Capnocytophaga</i>	68
<i>Eikenella</i>	68
<i>Kingella</i>	68
<i>Cardiobacterium hominis</i>	69
<i>Chromobacterium violaceum</i>	69
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	70
8. Bactérias anaeróbias estritas	71
Introdução.....	71
Coleta de material	73
Transporte do material.....	73
Processamento do material.....	73
Identificação bacteriana	74
Provas de sensibilidade a antimicrobianos.....	77
9. Interpretação de Resultados e laudos	78
Introdução.....	78
Laudo para o trato respiratório superior	79
Laudo para escarro.....	81
Laudo para secreção endotraqueal, lavado traqueal, e lavado brônquico	81
Laudo para lavado brocoalveolar ou escovado brônquico	82
Laudo para pleural.....	84
Laudo para abscesso pulmonar	84
Laudo para ocular.....	84
Laudo para líquido céfalo raquidiano (LCR)	85
Laudo para fezes	85
Laudo para pele, abscessos e feridas	86
Laudo para genital.....	88
Laudo para urina	89
Laudo para sangue	92
10. Referências Bibliográficas	93

1. ESTAFILOCOCOS, ESTREPTOCOCOS, ENTEROCOCOS E OUTROS COCOS GRAM POSITIVOS

INTRODUÇÃO

Os Estafilococos são as bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente. Podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal. No entanto, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção hospitalar, este microrganismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos saudáveis são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, e podem albergar o microrganismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na vagina. A partir destes sítios, o *S. aureus* pode contaminar a pele e membranas mucosas do paciente, objetos inanimados ou outros pacientes por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados.

Já foram descritos no Brasil casos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* parcialmente resistentes aos antibióticos mais potentes como a Vancomicina, e relatos da capacidade que os *Staphylococcus* coagulase negativa tem de desenvolver resistência. Assim há necessidade de uma identificação rápida e eficiente de todos os casos em que estes microrganismos se apresentam.

Os estreptococos foram os maiores causadores de infecção hospitalar na era pré-antibiótica, causando surtos de infecção e morte de puérperas. Apesar de não serem atualmente uma importante causa de infecção hospitalar, provocam, no entanto, doenças muito graves e muitas vezes letais, mesmo em pacientes imunocompetentes, sendo importante o rápido diagnóstico deste agente.

Já os enterococos apresentam importância crescente como causadores de infecção hospitalar, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento destas infecções.

Os Enterococos mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium*, com grande capacidade de colonização de pacientes e de contaminarem superfícies ou equipamentos utilizados em hospitais. Possuem sensibilidade ou resistência variável aos antibióticos chamados glicopeptídios como a vancomicina e teicoplanina. Existem, atualmente, cepas comensais naturalmente resistentes a vancomicina e que podem ser isoladas de pacientes internados, porém não sendo ainda capazes de causarem surtos, mas que devem ser corretamente identificadas.

IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR

A identificação dos estreptococos e estafilococos é baseada na morfologia que apresentam em meios líquidos. Sendo o estreptococo uma cadeia normalmente longa e os estafilococos mostrando-se em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados.

A identificação presuntiva começa com a inoculação primária na placa de ágar sangue de carneiro que deve ser incubada em 5% de tensão de CO₂ (método da vela ou estufa de CO₂). As colônias de estafilococos são geralmente maiores, convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo podendo apresentar hemólise ou não. Note-se que o desenvolvimento da cor amarelada no *S. aureus* ocorre somente após incubação prolongada (72 h), à temperatura ambiente. As colônias de estreptococos tendem a serem menores (puntiformes), e com halos de hemólise total ou parcial (beta e alfa hemólise). A diferenciação entre os estreptococos e os estafilococos se dá, seguramente, pela prova da catalase.

PROVA DA CATALASE

Com a alça bacteriológica ou com um palito coleta-se o centro de uma colônia suspeita e esfrega-se em uma lamina de vidro. Colocar sobre este esfregaço uma gota de água oxigenada a 3% e observar a formação de bolhas. Para a família Micrococaceae (estafilococos) a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcaceae (estreptococos) é negativa.

Divisão dos cocos Gram positivo pela prova da catalase

Catalase positivos	Catalase negativos
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Planococcus</i> spp.	<i>Aerococcus</i> spp.
<i>Stomatococcus</i> spp.	<i>Gemella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.
	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Stomatococcus</i> spp.

Ao coletar a colônia, não carregar meio de cultura (ágar sangue), que pode acarretar resultados falso-positivos porque o sangue do meio contém catalase. Algumas cepas de enterococos podem dar falsa reação positiva (fazer Gram e ver disposição em cadeias curtas ou aos pares).

Identificação simplificada dos cocos Gram positivo de importância clínica

Gênero	Catalase	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	Tétrade
<i>Staphylococcus</i>	+	neg	+	neg	não	variável
<i>Planococcus</i>	+	+	+	neg	+	variável
<i>Micrococcus</i>	+	neg	+	+	variável	variável
<i>Enterococcus</i>	neg	variável	+	neg	não	não
<i>Streptococcus</i>	neg	neg	variável	neg	não	não
<i>Aerococcus</i>	neg	neg	+	neg	não	+
<i>Stomatococcus</i> *	variável	neg	neg	neg	não	variável

* aderente ao meio

Cocos Gram positivo, Catalase negativa, Motilidade Negativa ¹

Gênero	NaCl 6,5%	Vancomicina	PYR	Bile Esculina	Tétrade
<i>Enterococcus</i>	+	variável	+	+	não
<i>Streptococcus</i>	neg	sensível	neg ²	neg ³	não
<i>Aerococcus</i>	+	sensível	variável	variável	variável
<i>Leuconostoc</i>	variável	resistente	neg	variável	não
<i>Pediococcus</i>	variável	resistente	neg	+	variável
<i>Gemella</i>	neg	sensível	+	neg	não
<i>Stomatococcus</i>	neg	sensível	+	+	variável

¹ *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* são positivos

² *S. pyogenes* é positivo

³ alguns *S. viridans* podem ser positivos

IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS

O teste mais importante na identificação da família Micrococcaceae é a prova da catalase, e esta família é composta de quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. O gênero *Staphylococcus* apresenta 32 espécies, 14 subnegespécies, sendo que somente 15 espécies são encontradas em amostras humanas, e de uma maneira prática, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos de acordo com a resposta ao teste da plasmogalactosidase.

Provas diferenciais dos generos Catalase positivos

Gênero	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	Tétrade
<i>Staphylococcus</i>	neg	+	neg	não	variável
<i>Planococcus</i>	+	+	neg	+	variável
<i>Micrococcus</i>	neg	+	+	+	+
<i>Stomatococcus</i>	neg	neg	neg	não	variável

Identificação das espécies de *Staphylococcus* de maior importância clínica

Espécie	DNase	PYR	Novob.	Uréia	Polimixina	Outras
<i>S. aureus</i>	+	neg	sensível	variável	resistente	pig. amarelo
<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	sensível	+	resistente	
<i>S. lugdunensis</i>	neg	+	sensível	variável	variável	omitina +
<i>S. haemolyticus</i>	neg	+	sensível	neg	sensível	omitina neg
<i>S. saprophyticus</i>	neg	neg	resistente	+	sensível	isolado em urina
<i>S. schleiferi</i>	neg	+	sensível	neg	sensível	Sacarose neg
<i>S. intermedius</i>	+	+	sensível	+	sensível	
<i>S. hyicus</i>	+	neg	sensível	variável	resistente	

Existem cerca de 31 espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa conhecidas, das quais os mais frequentes são:

- *Staphylococcus epidermidis* - causador de infecções de cateteres e próteses e o mais frequente microrganismo encontrado em hemoculturas.
- *Staphylococcus saprophyticus* - causador de infecção urinária em mulheres jovens.
- *Staphylococcus haemolyticus* - importante devido à resistência aumentada aos antimicrobianos, e por ser comumente confundido com o *S. aureus*, pois apresenta hemólise na placa de ágar sangue de carneiro.

TESTE DA RESISTÊNCIA A NOVOBIOCINA

A cepa é semeada de maneira semelhante ao antibiograma em placa de Muller Hinton acrescida de um disco teste de novobiocina contendo 5 µg. As amostras resistentes mostram zonas de inibição de 6 a 12 mm, enquanto as susceptíveis apresentam halos de 16 mm ou mais. As cepas de *Staphylococcus saprophyticus* são resistentes.

Testes da Trealose, Urease e Novobiocina

Espécies	Trealose	Urease	Novobiocina
<i>S. epidermidis</i>	Negativa	Positiva	Sensível
<i>S. haemolyticus</i>	Positiva	Negativa	Sensível
<i>S. saprophyticus</i>	Positiva	Positiva	Resistente

IDENTIFICAÇÃO DOS STAPHYLOCOCCUS AUREUS

A forma mais simples de identificar o *Staphylococcus aureus* é a prova da coagulase que pode ser efetuada em tubo ou em lâmina.

TESTE DA COAGULASE EM LÂMINA

A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante) "clumping factor" na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma causando a coagulação do mesmo.

- Colocar 2 gotas de salina em uma lâmina;
- Emulsionar uma colônia isolada a ser testada;
- Colocar uma gota de plasma e misturar com um palito de plástico ou madeira;
- Observar se há aglutinação em 10 segundos;
- Não se pode executar este teste a partir de um ágar com grande concentração de sal como ágar manitol.

TESTE DA COAGULASE EM TUBO

Este teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. O teste é melhor efetuado se:

- Adicionar 0,1 ml de caldo BHI, incubado por uma noite, com colônia suspeita a um tubo de ensaio com 0,5 ml de plasma;
- Incubar por 4 horas à 35°C em estufa ou banho maria;
- A formação do coágulo é observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90 graus da vertical.

Um método alternativo é a emulsificação desta mesma colônia suspeita em um 0,5 plasma e incubado da mesma forma. Qualquer coágulo indica uma prova positiva, porém não confundir com precipitados ou floculação. O melhor plasma a ser usado é o de coelho com EDTA, não devendo ser usado o plasma humano vindo do banco de sangue.

TESTE DA DNASE

Este teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA, (DNase test agar) obtido comercialmente.

- Adicionar ao meio original azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; o meio adquire uma coloração azul intensa;
- Incubar a 35°C por 24 horas;
- Uma coloração rósea característica ao redor das colônias produtoras de DNase indica a positividade da prova.

O meio adicionado com corante demonstra uma melhor facilidade na leitura, e permite o repique da amostra positiva para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, evitando que se retorne à placa original onde nem sempre as colônias estão bem isoladas.

TESTE DA ENDONUCLEASE

Teste da endonuclease termoestável é efetuado no mesmo meio de DNA.

- Ferver o caldo de cultura com a bactéria suspeita por 15 minutos;
- Colocar ao meio de DNA gotas de caldo de cultura turvo com a colônia suspeita;
- Fazer pequenos orifícios no meio (em placa) utilizando canudos de refrigerante;
- A leitura do teste é semelhante ao da DNase.

Note que este método pode ser efetuado a partir de caldo de hemocultura em que foi observado o crescimento de cocos Gram positivos agrupados.

OUTRAS PROVAS QUE DIFERENCIAM O STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Aglutinação em látex ou em hemácias de carneiro (sorologia). Estes testes geralmente detectam a coagulase livre e alguns apresentam também uma imunoglobulina antiproteína A presente da parede do *Staphylococcus aureus*. Como são disponíveis comercialmente, deve-se seguir as instruções do fabricante.

TESTE DO CRESCIMENTO EM ÁGAR MANITOL

O *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5 % de cloreto de sódio, denominado ágar manitol salgado ou Meio de Chapman. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado.

IDENTIFICAÇÃO DE OUTROS GÊNEROS

A diferenciação entre *Micrococcus sp* e os *Staphylococcus sp* se dá pela coloração de Gram, em que os *Micrococcus* aparecem em tétrades, ou pela pigmentação de suas colônias (amarelas, róseas ou alaranjadas). Alguns não apresentam pigmentos e podem ser diferenciados pela sensibilidade a Bacitracina 0,004 UI, a mesma utilizada na identificação de *Streptococcus pyogenes*, mas utilizando-se a inoculação em ágar Mueller Hinton.

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTREPTOCOCOS

Os estreptococos podem ser diferenciados de acordo com sua aparência na placa de ágar sangue após incubação a 35°C em presença de 5% de CO₂, podendo apresentar: hemólise total (beta), parcial (alfa, de cor esverdeada) ou nenhuma (gama).

A identificação de espécie de estreptococos beta hemolíticos é feita através de aglutinação com soros específicos contra os antígenos de Lancefield (A, B, C, D, F e G), que constitui uma prova rápida, porém não acessível a todos os laboratórios em virtude do elevado custo.

TESTE DA BACITRACINA

É importante notar que as identificações devem ser feitas em ágar sangue sem tensão de CO₂ ou os resultados podem ser conflitantes.

- Semear meia placa de ágar sangue com o estreptococo a ser identificado, como para um antibiograma;
- Colocar o disco de bacitracina 0,004 u como indicado;
- Incubar por uma noite a 35°C sem CO₂;
- Observar qualquer zona de inibição como resultado de sensibilidade.

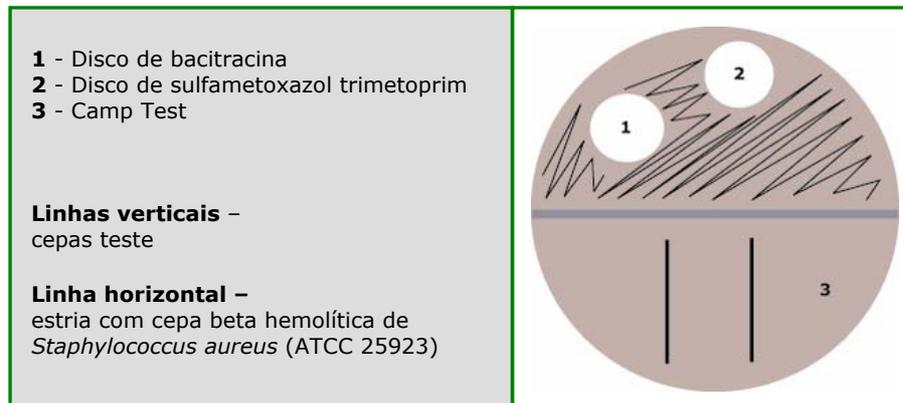
O *Streptococcus pyogenes* (grupo A) é assim rapidamente identificado.

TESTE DO SULFAMETOXAZOL TRIMETOPRIM (SXT)

- Adicionar na mesma placa de ágar sangue o disco de SXT;
- Incubar por uma noite a 35°C sem CO₂.

A sensibilidade a esta droga significa, em conjunto com as outras leituras, que o estreptococo não pertence ao grupo A, B ou D de Lancefield.

- Colocar um disco de Bacitracina 0,004 UI à direita e um de Sulfametoxazol-trimetoprim à esquerda.
- Havendo necessidade, pode ser feito o teste de CAMP na mesma placa, conforme desenho abaixo.



TESTE DE CAMP (NA MESMA PLACA)

- Inocular uma estria única de uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtor de beta lisina (ATCC 25923) no centro de uma placa de ágar sangue preparada obrigatoriamente com sangue de carneiro. (Esta linhagem de *S. aureus* deve ser mantida continuamente em estoque)
- Inocular as amostras a serem testadas em estrias formando um ângulo reto com a linha de inoculação da amostra teste de estafilococo. As estrias não devem se tocar, ficando a 1 mm de distância, e deste modo várias amostras podem ser testadas em uma mesma placa de ágar sangue. A maneira de inocular é fundamental para a observação do efeito esperado.
- Incubar a placa a 35-37°C durante um período de 18-24 horas.
- A positividade da prova, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), é evidenciada pelo alargamento da zona de lise, que adquire a forma de ponta de flecha característica, na área de intersecção entre as duas estrias.

TESTE DO PYR

Este teste determina a atividade do PYR também chamado pyrrolidonyl-aminopeptidase, uma enzima produzida pelo *Streptococcus pyogenes* e também pelo *Enterococcus sp.* Utilizar somente colônias puras para o teste, pois podem surgir resultados errôneos. Seguir as instruções do fabricante, uma vez que se encontra disponível comercialmente.

Esse teste é tecnicamente, equivalente à prova da hidrólise da bile esculina e crescimento em 6,5% de NaCl, usados na identificação clássica dos enterococos, e mais específico que o teste da Bacitracina na caracterização presuntiva dos estreptococos beta hemolíticos do grupo "A", tendo a vantagem de ser mais rápido.

Em qualquer dos dois casos, o PYR constitui uma alternativa importante para esclarecer testes duvidosos. Na impossibilidade da realização de testes sorológicos de confirmação, reforçar o valor dos testes presuntivos clássicos de identificação do *Streptococcus pyogenes*.

TESTE DA BILE ESCULINA E DO NACL 6,5%

- Semear as provas de Bile Esculina e do caldo de NaCl a 6,5%;
- Incubar da mesma forma;
- Teste da bile esculina positiva apresenta cor marrom escuro e o do caldo de NaCl a 6,5 % deve mostrar turvação para ser considerado positivo.

Todos os estreptococos do grupo D de Lancefield apresentam a bile esculina positiva, seja *Enterococcus sp* ou *Streptococcus* do grupo D não enterococo (*Streptococcus bovis*). Quanto ao teste da tolerância ao NaCl a 6,5%, somente os enterococos são positivos.

Identificação de estreptococos beta hemolíticos

Identificação	Sensibilidade a Bacitracina	CAMP /Hidrólise de hipurato	Sensibilidade a SXT	Bile Esculina e Tolerância a NaCl 6,5%
<i>S. pyogenes</i>	sensível	negativo	negativo	negativos
<i>S. agalactiae</i>	resistente	positivo	negativo	negativos
<i>Enterococcus sp</i>	resistente	negativo	negativo	positivos
Estreptococo Não A, B ou D.	resistente	negativo	positivo	negativos

TESTE DA HIDRÓLISE DO HIPURATO

Os *Streptococcus agalactiae* (grupo B) são também capazes de hidrolisar o hipurato em seus componentes: glicina e ácido benzóico. Identificação presuntiva dos estreptococos beta hemolíticos do grupo A, B e D.

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTREPTOCOCOS NÃO BETA HEMOLÍTICOS

Somente os estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) e D (*Enterococcus spp.* e *Streptococcus bovis*) podem não apresentar nenhuma hemólise, a denominada gama hemólise.

Identificação de estreptococos gama hemolíticos ou sem hemólise

Identificação	CAMP /Hidrólise de hipurato	Bile Esculina	Tolerância a NaCl 6,5%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	positivo	negativo	negativo
Enterococo	negativo	positivo	positivo
<i>S. bovis</i>	negativo	positivo	negativo

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTREPTOCOCOS ALFA HEMOLÍTICOS

A identificação deste grupo não deve ser feita por métodos sorológicos, pois a maioria não possui os antígenos de Lancefield.

Identificação dos estreptococos alfa hemolíticos

Identificação	Optoquina e Bile solubilidade	Bile esculina	Tolerância 6,5% a NaCl
Pneumococo	positivo	negativo	negativo
Enterococos	negativo	positivo	positivo
Grupo viridans	negativo	negativo	negativo
<i>Streptococcus bovis</i>	negativo	positivo	negativo

TESTE DA OPTOQUINA

- Semear um quarto de uma placa de ágar sangue com a cepa alfa hemolítica a ser testada;
- Aplicar um disco de optoquina;
- Incubar a 35°C em tensão aumentada de CO₂ - método da vela;
- Uma zona de inibição de 14 mm ou mais à volta de um disco de 6 mm significa sensibilidade e identifica o *Streptococcus pneumoniae*.

TESTE DA BILE SOLUBILIDADE

O teste da bile solubilidade também identifica o *Streptococcus pneumoniae*. Pode ser executado em placa ou em caldo.

Placa:

- Tomar um caldo turvo após 3 horas de incubação a 35°C;
- Inocular uma suspensão de desoxicolato a 10%;
- Clareamento da turbidez reflete a lise bacteriana e confere um resultado positivo à prova.

Caldo:

- Inocular gotas de desoxicolato de Sódio a 2% sobre as colônias suspeitas;
- Incubar a 35°C por 30 minutos;
- As colônias positivas irão desaparecer por lise bacteriana.

Suspeitar da presença de "variante nutricional de *Streptococcus*" destes microrganismos quando o Gram de amostras positivas de hemocultura obtidas em meios comerciais mostram cocos em cadeias que não crescem no subcultivo em ágar sangue.

- Semear o repique em ágar sangue;
- Fazer estrias perpendiculares ao sentido da sementeira com *Staphylococcus aureus*, como para a identificação presuntiva de *Haemophilus influenzae*;
- Incubar a 35°C em atmosfera com CO₂.

Identificação dos enterococos mais importantes clinicamente

Espécie	Arabinos	Sorbitol	Crescimento Telurito 0,04%	Motilidade	Pigmento	Vancomicina
<i>E. faecalis</i>	negativo	positivo	positivo	negativa	negativo	variável (s)
<i>E. faecium</i>	positivo	variável	negativo	negativa	negativo	variável
<i>E. casseliflavus</i>	positivo	variável	negativo	positiva	positivo	resistente
<i>E. gallinarum</i>	positivo	negativo	negativo	positiva	negativo	resistente

2. NEISSERIAS

INTRODUÇÃO

As espécies de *Neisseria* tem como característica morfológica serem diplococos Gram negativos mais achatadas nas laterais, dando a forma de rins ou dois grãos de feijão unidos por uma ponte. Apenas a espécie *N. elongata* difere desta morfologia, sendo diplobacilos ou diplococo-bacilo.

Todas neisserias são oxidase positivas e catalase positivas, exceto *Neisseria elongata* e *Kingella denitrificans*. Todas utilizam carboidratos por via oxidativa e não fermentativa, sendo baixa a acidez, de modo que podem acontecer reações duvidosas com o meio CTA (Cystine Tripticase Agar) com indicador vermelho de fenol, que sempre foi muito utilizado em rotina.

As diferentes espécies de neisseria, incluindo *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, são analisadas junto com a *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., *Kingella* spp e *Alcaligenes* spp. pelas características morfológicas de serem cocos ou cocóides ao Gram e pela possibilidade de haver confusão na sua identificação.

Quanto a sua importância clínica, a maioria das neisserias é comensal vivendo em mucosas de humanos e animais.

Diagnóstico diferencial entre Neisserias e outros cocobacilos Gram negativo

Bactéria	Morfol.	OXI	CAT	OF Gli	CTA Gli	DNase	AS	MOT
<i>Neisseria meningitidis</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	+	neg
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	neg	neg
<i>Neisseria</i> spp.	diplococo/ bacilo	+	variável	variável (oxidativo)	variável	neg	+	neg
<i>Moraxella catharralis</i>	diplococo	+	+	inerte	neg	+	+	neg
<i>Kingella</i> spp.	cocobacilo	+	neg	fermentador	+	neg	+	variável
<i>Moraxella</i> spp.	cocobacilo	+	+	inerte	neg	neg	+	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	cocobacilo	neg	+	variável (oxidativo)	variável	neg	+	neg
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Cocobacilo / bacilo	+	+	inerte	neg	neg	+	+

OXI = oxidase CAT=catalase OFGli=OF Glicose CTAGli= utilização da glicose em base ágar cistina tripticase
AS = crescimento em Ágar Sangue MOT = motilidade

CARACTERÍSTICAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	É sempre considerada patogênica, de transmissão sexual ou pelo parto e indicativa de tratamento. No homem causa uretrite, sendo até 50% assintomática e está relacionada a complicações como epididimite, prostatite e estenose uretral. Na mulher causa corrimento vaginal, endocervicite, uretrite, abscesso vestibular, salpingoneooforite e doença inflamatória pélvica. Pode ser isolada também na mucosa oral e anal, e em recém-nascidos pode causar uma conjuntivite denominada Oftalmia neonatorum. A doença sistêmica disseminada pode ocorrer em 1 a 3% dos pacientes infectados, principalmente em assintomáticos e caracterizada por febre, tremores, lesões cutâneas, artrite de extremidades. As lesões cutâneas são do tipo máculo-pustulares ou hemorrágicas, com centro de necrose. Raramente ocorre artrite séptica com 50% de positividade de isolamento. Pode ocorrer meningite e endocardite.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Pode causar meningite, infecção sistêmica grave com coagulação intravascular disseminada (CIVD) e elevada mortalidade, podendo causar em associação outras infecções (conjuntivite, artrite, sinusite e pneumonia). Em mucosas pode ser isolada em portadores sãos em 5 a 15 % dos indivíduos e por períodos de semanas a meses. A transmissão se faz por vias aéreas.

Moraxella
(Branhamella)
catarrhalis

Potencial patógeno de vias aéreas, principalmente em crianças e adultos jovens. Causa com maior frequência otite, sinusite e pneumonia. Mais raramente pode causar endocardite e meningite. Em idosos, após o *Haemophilus influenzae* e o Pneumococo, constitui a terceira causa de pneumonia em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Em adultos raramente é isolada em pacientes assintomáticos. Cerca de 80% das cepas são produtoras de beta-lactamase, e são detectadas através do teste do Nitrocefim (cefalosporina cromogênica). Outras espécies de *Neisseria* raramente são isoladas em casos de endocardite

ISOLAMENTO

NEISSERIA GONORRHOEAE

Material clínico para isolamento (escolha depende dos sintomas):

- Uretral
- Endocervical (sexualmente ativas/vaginal em meninas)
- Retal (colher secreção mucosa e não fezes, utilizando meio seletivo tipo Thayer Martin)
- Orofaringe
- Conjuntiva
- Glândula de Bartholin
- Trompas
- Endométrio
- Líquido sinovial
- Lesões de pele
- Sangue

Recomenda-se:

- Utilizar swab com algodão atóxico ou swab de Rayon ou Dacron.
- Semear o mais rápido possível nos meios sólidos, e usar placas aquecidas previamente em estufa.
- Urina pode ser utilizada, após centrifugação rápida e semeadura do sedimento.
- Em meio seletivo, deve-se, no entanto, preferir outros materiais com maior chance de isolamento.
- Usar frascos de hemocultura sem o anticoagulante SPS que é inibidor para as *N. Gonorrhoeae* (Ex: Caldo BHI com 1% de gelatina).
- Em lesões de pele preferir a biópsia que o swab.
- Incubar em jarra com umidade e vela.
- Sempre realizar bacterioscopia pelo Gram.

NEISSERIA MENINGITIDIS

Materiais clínicos para isolamento, de acordo com aspectos clínicos:

- LCR
- Sangue (usar frascos de hemocultura sem SPS como anti-coagulante)
- Aspirado de petéquias
- Sufusões hemorrágicas ou biópsias
- Líquido sinovial
- Swab de conjuntiva
- Aspirado traqueal, ou transtraqueal ou escarro
- Swab de nasofaringe (preferível a swab de orofaringe)

MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS

Material clínico adequado para isolamento de acordo com o quadro clínico:

Otite média	Timpanocentese (miringotomia) quando indicado. Secreção colhida com swab em geral revela flora contaminante, exceto se rompimento espontâneo muito recente e sem uso prévio de antimicrobianos.
Sinusite	Aspirado de seios da face comprometidos, quando indicado.
Infecções do trato respiratório inferior/pneumonia	Escarro, aspirado traqueal, transtraqueal podem ser úteis ou BAL, quando indicado e comparados com bacterioscopia.

TRANSPORTE E SEMEADURA DO MATERIAL

O ideal é semear imediatamente após a coleta em meio sólido, levar para a estufa 36°C em jarra com vela ou com gerador de CO₂ e umidade. O uso de meios de transporte como Stuart ou Amies deve ser considerada uma alternativa de risco. Para *M. catarrhalis*, os meios de transporte são adequados.

NEISSERIA GONORRHOEAE

- É sensível a variações de temperatura acima de 37°C ou abaixo de 35°C, de modo que a amostra não pode ser refrigerada.
- Recomenda-se ágar chocolate enriquecido com suplemento com l-cisteína, NAD e vitaminas (Isovitalex ou similar), embora seja possível obter crescimento de algumas cepas em ágar sangue.
- Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO₂ (jarra com vela ou gerador de CO₂).
- Secreção retal, swab de orofaringe, ou outros materiais com maior microbiota contaminante ou menor expectativa de isolamento, semear, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado (TMM) ou meio New York City (NYC).

NEISSERIA MENINGITIDIS

- É um pouco mais tolerante a variações de temperatura, mas recomenda-se para transporte ambientes com CO₂.
- Cresce bem em ágar sangue, mas por precaução, deve-se semear também em ágar chocolate.
- Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO₂ (jarra com vela ou gerador de CO₂).
- Materiais com maior flora contaminante ou menor expectativa de isolamento, semear, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado (TMM) ou meio New York City (NYC).
- Meios seletivos como TMM inibem crescimento de enterobactérias, a maioria das outras espécies de Neisserias (7,5 µg/ml de colistina), Gram positivos (Vancomicina 3 µg/ml) e fungos (13,5 µg/ml de nistatina); e contém suplementos para suportar crescimento das *Neisserias meningitidis* e *N. gonorrhoeae*.

MORAXELLA CATHARRALIS

- Tolerância temperatura ambiente e cresce bem em ágar sangue.
- Material estéril ou com pouca microbiota (LCR, sinovial, sangue, biópsia, conjuntiva, nasofaringe).
- Pode usar meio não seletivo

BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

- A partir das amostras genitais, LCR, biópsia, etc., deve-se sempre reservar material para a bacterioscopia, fazendo o esfregaço no momento da coleta, ou colhendo dois swabs, ou material suficiente para a semeadura e bacterioscopia.
- Quando o swab é único, no caso das Neisserias dá-se preferência à semeadura imediata e posteriormente:
 - Ressuspender o swab em 1 ml de salina;
 - Agitar no Vortex;
 - Centrifugar;
 - Fazer um esfregaço do sedimento.
- Relatar a bacterioscopia de modo a quantificar no material analisado a presença ou ausência de diplococos Gram negativos com características de neisserias em:
 - raros (+) - moderados (+++)
 - poucos (++) - muitos (++++)
- Descrever se os microrganismos são extra-celulares ou intra-celulares e quantidade de neutrófilos e de células epiteliais.

- É importante correlacionar a bacterioscopia com achados de cultura e dados do paciente, como quadro agudo, portador, etc. Em casos de abuso sexual é fundamental o isolamento e identificação completa, considerando que neisserias saprófitas ou mesmo *Acinetobacter* spp. podem ser diagnosticados erroneamente como *N. gonorrhoeae*.

IDENTIFICAÇÃO

As *N. gonorrhoeae* crescem em ágar chocolate formando colônias pequenas, sendo em geral menores que as de neisserias saprófitas. A cor pode variar de cinza a amarelo. A colônia da *M. catarrhalis* é de cor cinza róseo-acinzentado, sendo comumente friável, saindo inteira quando removida com a alça bacteriológica. As colônias de *N. meningitidis* A e C capsuladas apresentam mucóides.

Testes imunológicos não substituem a cultura e a bacterioscopia, e para o diagnóstico da gonorréia existem no comércio recursos do tipo ELISA, sondas genéticas de ácido nucléico, PCR e suas variantes, de elevado custo e indicado em levantamentos epidemiológicos, ou quando não se dispõe dos recursos tradicionais.

Para LCR e outros fluídos estéreis e mesmo urina, a caracterização de *Neisseria meningitidis* pode ser feita pela técnica de aglutinação com partículas de látex que é rápida, com boa sensibilidade, especificidade e permite a tipagem dos principais tipos prevalentes em meningites. O teste pode ser positivo nos casos de cultura negativa por uso prévio de antimicrobianos, sendo, no entanto, de custo elevado. Para o tipo B alguns produtos oferecem testes para afastar reação cruzada com *E. coli*. A reação negativa não exclui o diagnóstico que deve ser sempre avaliado juntamente com a bacterioscopia e a cultura.

BACTERIOLOGIA

A identificação de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* pode ser feita em dois níveis: presuntivo e confirmatório. Em serviços de Saúde Pública (DST) onde a prevalência da gonorréia é significativa, para fins práticos de tratamento pode-se fazer o diagnóstico utilizando-se aspectos clínicos associados à bacterioscopia positiva (Diplococos Gram negativos intra-celulares) em pacientes de risco. Deve-se, no entanto, sempre colher material para cultura, possibilitando a confirmação e monitoramento da resistência destas bactérias.

Na ocorrência de surtos de meningite meningocócica, o diagnóstico presuntivo para fins de tratamento, também pode basear-se na clínica e na bacterioscopia do LCR ou de lesões (petéquias e púrpuras). As culturas devem sempre ser colhidas para confirmação, identificação de sorotipo e sensibilidade aos antimicrobianos através dos seguintes procedimentos:

- Fazer bacterioscopia das colônias isoladas para confirmar a presença de diplococos Gram negativos com forma de dois feijões.
- Fazer o teste de oxidase das colônias sugestivas.
- Deve-se procurar afastar outros gêneros de bactérias como *Acinetobacter* spp., *Kingella* spp. e *Moraxella* spp. que são morfologicamente parecidos. Um recurso prático para evitar erros de identificação de *Acinetobacter* spp. e *Kingella* spp. como Neisserias é:
 - Semear o agente suspeito em ágar chocolate.
 - Colocar um disco de penicilina de 10 ui.
 - Após 24h fazer um gram das colônias que crescerem próximas a zona de inibição.
 - Se permanecerem cocóides com aspecto de neisserias confirma-se o isolamento; caso tenham adquirido a forma de bacilos longos, o isolado não é de Neisseria.
- Outro passo importante é verificar a capacidade de crescimento em meios pobres como o ágar nutriente ou a necessidade de crescimento em meio rico (ágar chocolate suplementado).
- A identificação das espécies de neisseria baseia-se na utilização de açúcares: glicose, maltose, lactose, sacarose e frutose. Como as neisserias utilizam carboidratos por via oxidativa, a base Ágar Cistina Tripticase (CTA) adicionada de 1% de cada um dos açúcares e com indicador vermelho de fenol tem sido utilizado. No entanto, reações duvidosas podem ocorrer, por falha na detecção da acidez produzida pela bactéria, dificultando a identificação. Recomenda-se enviar a cepa isolada rapidamente ao Laboratório de Referência para confirmação.

Provas de rotina para diferenciar Neisserias patogênicas

Bactéria	AC 22°C	A. Nut. 35°C	DNase	GLI	MAL	LAC	SAC	FRU
<i>N. gonorrhoeae</i>	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg
<i>N. meningitidis</i>	neg	v	neg	+	+	neg	neg	neg
Outras neisserias	+	+	neg	variável	variável	variável	variável	variável
<i>M. catharralis</i>	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Kingella</i> spp.	v	+	neg	+	neg	neg	neg	neg

AC = crescimento em ágar chocolate a 22°C

A. Nut. = crescimento em ágar nutriente a 35°C

GLI = glicose MAL = maltose LAC = lactose

SAC = sacarose FRU = frutose

3. ENTEROBACTÉRIAS

INTRODUÇÃO

É a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram negativas de importância médica. São considerados atualmente: 27 gêneros / 102 espécies / 08 grupos indefinidos. Independente da complexidade, mais de 95% das amostras implicadas em caso clínicos são colocadas em 25 espécies, sendo possível o isolamento de enterobactérias de qualquer amostra clínica.

CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

São bacilos Gram negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, e que crescem em meios básicos (caldo peptona), meios ricos (ágar sangue, ágar chocolate e CLED), meios seletivos (Mac Conkey, EMB). São anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose), fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos, e reduzem nitrato a nitrito.

São divididos através de diferentes provas em 11 principais gêneros, tendo sido descritos nos últimos anos outros 16 gêneros e algumas espécies, mas ainda consideradas de pouca ou nenhuma importância clínica.

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

- A maioria das enterobactérias é encontrada no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais.
- Alguns também são considerados enteropatógenos por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais como a *Salmonella typhi*, outras salmonellas, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e vários sorotipos de *Escherichia coli*, embora possam também causar infecção em outros locais.
- As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica
- São responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias.

INFECÇÕES HOSPITALARES E NA COMUNIDADE

Nas infecções hospitalares:

- As enterobactérias que atualmente predominam são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.
- Principais gêneros das enterobactérias (cerca de 99% dos isolamentos de enterobactérias de importância clínica): *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp.
- As enterobactérias menos isoladas são: *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp.
- Baseado em dados de prevalência e importância clínica, considera-se necessário que os laboratórios de microbiologia utilizem metodologia que permita discriminar com $\geq 80\%$ de acerto os gêneros e espécies considerados abaixo:

- | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| - <i>Escherichia coli</i> | - <i>Citrobacter koseri</i> | - <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| - <i>Shigella</i> spp. | - <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> |
| - <i>Salmonella typhi</i> | - <i>Klebsiella oxytoca</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> |
| - <i>Salmonella</i> spp. | - <i>Providencia</i> spp. | - <i>Enterobacter agglomerans</i> |
| - <i>Citrobacter freundii</i> | - <i>Serratia</i> spp. | - <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| - <i>Proteus mirabilis</i> | - <i>Proteus vulgaris</i> | - <i>Morganella morganii</i> |

Nas infecções da comunidade:

- Destacam-se: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.

Principais provas para a identificação das enterobactérias de importância clínica

1. Fermentação da glicose
2. Fermentação da lactose
3. Motilidade
4. Utilização de citrato
5. Descarboxilação da lisina
6. Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)
7. Produção de gás (CO₂)
8. Oxidase
9. Produção de indol
10. Produção de urease
11. Produção de fenilalanina desaminase ou opção triptofanase
12. Produção de gelatinase ou opção DNase

Provas complementares de Identificação

- Fermentação de outros carboidratos: sacarose, maltose, arabinose, salicina, dulcitol, manitol, etc.
- Utilização de aminoácidos: arginina e ornitina
- Hidrólise da esculina, etc.
- ONPG
- Utilização de acetato
- Provas úteis, mas pouco utilizadas: vermelho de metila, voges-proskauer, crescimento em KCN, tartarato de jordan e lipase.

Os esquemas de identificação baseiam-se na determinação dos gêneros e espécies mais isolados na clínica, e nas provas mais características de cada gênero e espécie, baseado em alguns critérios como: facilidade de execução, facilidade de interpretação, custo, rapidez para leitura, etc.

TIPOS DE TESTES UTILIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO

- Podem ser utilizados testes preparados no laboratório, desde que submetidos a controle de qualidade.
- Adquiridos no comércio em testes isolados ou em kits acompanhados dos respectivos esquemas de identificação.
- Métodos automatizados em geral utilizam estas mesmas provas e ampliam o número de testes podendo caracterizar com maior segurança e melhor poder de discriminação de gêneros e espécies não comuns.
- Métodos rápidos em geral utilizam substratos cromogênicos para detecção de enzimas produzidas pelas bactérias e que se revelam após 4 a 6 horas de incubação.

Na rotina bacteriológica, existem várias alternativas e, com base em conjuntos ou sistemas simplificados de provas bioquímicas, é possível realizar a triagem e identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico. Desse modo, das enterobactérias isoladas de amostras clínicas, cerca de 90%, podem ser perfeitamente identificadas através desses esquemas, podendo o resultado ser entregue dentro de um espaço de tempo relativamente curto, geralmente, entre 48 a 72 horas.

MEIO IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ)

Este meio foi elaborado para triagem de enterobactérias e consiste de 9 provas em apenas um tubo de ensaio, que consistem em: indol (tampa), fermentação da sacarose e glicose e produção de gás, fenilalanina, uréia, H₂S, Lisina, Motilidade.

Baseado nestas provas é possível identificar as seguintes bactérias:

- | | | |
|--|--|--|
| - <i>E. coli</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> | - <i>Salmonella typhi</i> |
| - <i>Shigella</i> (indol positiva) | - <i>Providencia</i> spp. (uréia positiva) ou <i>Morganella morganii</i> | - <i>Citrobacter freundii</i> |
| - <i>Shigella</i> (indol negativa) | - <i>Providencia</i> spp. (uréia negativa) | - <i>Serratia marcescens</i> (provas complementares) |
| - <i>Enterobacter aerogenes</i> | - <i>Proteus mirabilis</i> | - <i>Vibrio cholerae</i> |
| - <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - <i>Proteus vulgaris</i> | - <i>Vibrio</i> spp. |
| - <i>Klebsiella</i> spp. (sacarose negativa) | - <i>Salmonella</i> spp. | - bactérias não fermentadoras |

Vantagens e limitações

O meio IAL tem a vantagem de ser prático para inoculação e de baixo custo. Sua desvantagem é a dificuldade de interpretação de tantas provas, exigindo muita experiência prévia com o meio. Este meio identifica os principais gêneros de enterobactérias, indicando a presença de bactérias não fermentadoras e *Vibrios*.

Para caracterizar corretamente as espécies de *Enterobacter*, gênero *Serratia*, gênero e espécies de *Pseudomonas* há necessidade de realizar provas complementares.

Pelas limitações do poder discriminatório de gêneros e espécies de enterobactérias não se recomenda este meio, como única opção, na identificação de bactérias envolvidas em infecções hospitalares. Uma alternativa seria utilizar os resultados obtidos do meio IAL como triagem e adicionar os testes complementares, como Citrato e a fermentação da lactose verificada no crescimento em ágar Mac Conkey.

Variantes do meio IAL

Tubo 1 – meio de Rugai sem sacarose provas: fenilalanina, fermentação da glicose, gás, H₂S, uréia

Tubo 2 – MIO (Motilidade Indol Ornitina)

Tubo 3 – lisina

Tubo 4 – citrato

Tubo 5 – rhamnose

CONJUNTO EPM / MiLI / CITRATO

Trata-se praticamente da mesma combinação de reações do meio IAL ou Rugai & Araújo (modificado por Pessoa & Silva), separados em 2 tubos, passando a verificação do indol da tampa do IAL, para o meio MILi após adição do reativo de Kovacs.

Tubo EPM	<ul style="list-style-type: none">- inocular picando até o fundo- semear na superfície- incubar com a tampa frouxa 24hs/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ Fermentação da glicose, produção de gás, H₂S, uréia, fenilalanina.
Tubo MILI	<ul style="list-style-type: none">- fazer picada central apenas- incubar 24hs/35°C- adicionar 3 gotas de reativo de Kovacs após a leitura da lisina para o teste de indol<ul style="list-style-type: none">▪ Motilidade: as imóveis crescem apenas na linha de picada.▪ Descarboxilação da lisina: lisina positiva o meio torna-se roxo, na prova negativa o meio permanece amarelado nos 2/3 inferiores.▪ Indol: a formação de um anel rosa na superfície do meio indica positividade para o indol.
Citrato	<ul style="list-style-type: none">- inocular a superfície- incubar 24hs/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ A prova positiva é evidenciada pelo aparecimento de coloração azul na superfície.

Interpretação do Meio EPM

Base	Produção de gás	Formação de bolhas ou rachaduras no meio
	Produção de H ₂ S	Presença de pigmento negro de qualquer intensidade
	Hidrólise da Uréia	Coloração azul esverdeada (fraca) na base indica prova positiva
Superfície	Desaminação do Triptofano	Reação positiva – verde escuro ou acastanhado Reação negativa – superfície inalterada

MEIO TRÍPLICE AÇUCAR FERRO (TSI)

Considerado o mais clássico dos sistemas de identificação, necessita de provas adicionais, mas tem a vantagem de ser de mais fácil interpretação. Abaixo será descrito em detalhes e será a base da identificação de enterobactérias.

Acurácia da identificação - qualquer sistema de testes existentes no comércio, com leitura manual ou automatizada, tem limitações no número de provas e de discriminação dos diferentes gêneros e espécies de enterobactérias, de modo que a maioria dos esquemas trabalha com um máximo de 80% de acerto. Os esquemas de identificação de enterobactérias podem utilizar uma ampla gama de recursos, variando desde nove reações como meio IAL ou Rugai & Araújo modificado por Pessoa & Silva, até dez testes propostos neste manual, ou sistemas como API 32E que pode identificar enterobactérias e alguns não fermentadores, utilizando 32 testes. É importante destacar que nenhum sistema oferece 100% de acerto para a caracterização das espécies de enterobactérias, mas analisam o principal comportamento descrito na literatura.

A fonte de informação mais utilizada baseia-se na tabela organizada por Farmer (1991) contando com 47 provas, e os respectivos percentuais de positividade para 28 diferentes gêneros e 121 espécies de enterobactérias. Os principais gêneros e espécies de importância clínica podem ser caracterizados com >95% de acerto com poucas provas. Entretanto para as espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* os testes mais utilizados apresentam baixo poder de discriminação, sendo a identificação feita pelo maior percentual de probabilidade.

É necessário destacar que padrões não usuais podem ocorrer e que o microbiologista deve estar atento para analisar cepas que possam ter importância clínica e epidemiológica ou encaminhá-las a Laboratórios de Referência. Antes, no entanto, deve certificar-se que a análise não esta sendo feita com cultura mista de bactérias.

O meio de TSI é inclinado em bico de flauta, de cor vermelho-cereja e deve ser inoculado por picada central até o fundo, seguido de espalhamento na superfície e incubação durante 18-24h a 35°C.

Provas do Meio de TSI

a) Púrpura/amarelo (ápice púrpuro e base amarela)	=	fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativas)
b) Amarelo/amarelo (ápice e base amarelos)	=	fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares)
c) Presença de gás (CO ₂)	=	bolhas ou meio fragmentado
d) H ₂ S positivo	=	presença de precipitado negro

Interpretação do resultado das reações encontradas no TSI

Ápice	Base	H ₂ S	Gás	Interpretação mais provável
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Sem crescimento = bactéria exigente
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Não Fermentador ou Gram (+)
Amarelo	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Gram (+)
Vermelho	Amarelo	neg	variável	Enterobactéria ou <i>Aeromonas</i> lactose e sacarose negativas
Amarelo	Amarelo	neg	variável	Enterobactéria
Amarelo	Amarelo	+	variável	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus/Morganella/Providencia</i> e <i>Citrobacter</i>

Obs. A presença de H₂S em bactérias lactose e sacarose negativas pode ser menos evidente, pois a precipitação de sais de ferro pelo sulfeto de hidrogênio depende de meio ácido (Ex: *Salmonella typhi*)

ETAPAS DA IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

ANÁLISE DO CRESCIMENTO NOS MEIOS RICOS E SELETIVOS

A identificação de uma enterobactéria começa com a análise do material semeado. Em geral temos os seguintes meios para interpretar:

- Secreções: ágar sangue e Mac Conkey
- Líquidos nobres e biópsias: Ágar Chocolate e Mac Conkey
- Fezes: Mac Conkey e Salmonella-Shigella
- Urina: CLED ou ágar sangue e Mac Conkey, etc.

Devemos considerar que:

- A enterobactéria sempre cresce nos meios ricos (ágar sangue, chocolate e CLED), bem como nos meios seletivos: ágar Mac Conkey e Salmonella-Shigella.
- Os Gram positivos como regra não crescem em ágar Mac Conkey e Salmonella-Shigella, exceto os enterococos que podem crescer.
- No ágar Mac Conkey e Salmonella-Shigella, além das enterobactérias e dos enterococos, podem crescer bactérias não fermentadoras e *Candida*.

Portanto caracteriza-se uma enterobactéria quando ela esta presente em todos os meios semeados, mas ainda é necessário diferenciar de outros microrganismos não muito exigentes como não fermentadores, enterococos e *Candida* spp.

Recomenda-se realizar:

- Gram da colônia isolada – sempre fazer o Gram para evitar enganos de interpretação (diferenciar cocos de bacilos, Gram positivos de Gram negativos e leveduras).
- Prova da oxidase – indicada para detectar e/ou diferenciar o grupo *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* que também são fermentadores.
- Prova do metabolismo fermentador – triagem utilizando os meios de OF glicose (quando suspeitar de não fermentador), TSI (Triplíce Açúcar Ferro) ou EPM (Rugai sem sacarose), para enterobactérias.
- Série bioquímica complementar – sempre necessária para caracterizar gênero e espécie. O número de provas vai permitir maior ou menor discriminação (vide a seguir o nível de complexidade de provas).

As Enterobactérias caracterizam-se por se apresentarem como: bacilos Gram negativos, fermentadores da glicose, com ou sem produção de gás, oxidase negativas, reduzem nitrato a nitrito e que crescem bem no meio de Mc Conkey ou EMB.

Como modelo de triagem na identificação bacteriana tem sido utilizado o meio de TSI (Triplíce Açúcar Ferro), que permite avaliar a fermentação da glicose, produção de gás, fermentação de lactose e/ou sacarose e produção de H₂S.

O TSI constitui o meio de identificação preliminar mais utilizado no mundo, sendo necessário, no entanto, necessário adicionar algumas provas, para completar a identificação e classificadas em dois níveis de complexidade:

Nível de complexidade 1	motilidade, indol, lisina, uréia, citrato, lactose (Mac Conkey), fenilalanina, DNase e oxidase.
Nível de complexidade 2	provas do nível 1 e ornitina, arginina, sacarose, arabinose, malonato, esculina e PYR.

DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS PROVAS BIOQUÍMICAS

Motilidade, H₂S e Indol	<ul style="list-style-type: none">- Semear por picada até o fundo, e incubar 24h/35°C- Após 24h de incubação, pingar 3-4 gotas de Kovacs na superfície do meio- Meios Motilidade/indol com resazurina (motilidade); SIM (motilidade, indol e H₂S) e Mili (Motilidade, Indol e Lisina)<ul style="list-style-type: none">▪ crescimento apenas na linha de picada = motilidade negativa▪ crescimento difuso em todo o meio = motilidade positiva▪ H₂S positivo = meio enegrecido▪ H₂S negativo = cor inalterada do meio Indol▪ cor púrpura = indol positivo▪ cor do reagente = indol negativo
Uréia de Christensen	<ul style="list-style-type: none">- Inocular apenas na superfície e incubar 24h/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ Urease positivo = cor vermelha (<i>Proteus</i>: reação mais intensa)▪ Urease negativo = mantém cor amarelada do meio
Citrato de Simmons	<ul style="list-style-type: none">- Inocular na superfície e incubar 24h/35°C<ul style="list-style-type: none">▪ Citrato positivo = azul e/ou crescimento no meio▪ Citrato negativo = cor verde (inalterado)
Fenilalanina	<ul style="list-style-type: none">- Inocular a superfície do meio (inclinado) e incubar 24h/35°C- Após crescimento pingar na superfície 5 gotas do reagente cloreto férrico a 10%<ul style="list-style-type: none">▪ FA positivo = cor verde escuro na superfície▪ FA negativo = mantém a cor do meio inalterada

IDENTIFICAÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

CONSIDERAÇÕES

- Valores positivos ou negativos referem-se a 80% ou mais de definição; para saber o real percentual de provas positivas ou negativas consultar a tabela geral.
- PB (padrão bioquímico) = probabilidade teórica da bactéria em questão; apresentar o padrão bioquímico analisado (os testes considerados são indicados pelo sinal #).
- Exemplo: PB para *Proteus vulgaris* em relação às provas, H₂S +(98%) FA +(95%) Indol + (98%) (multiplicar os percentuais de ocorrência)= 92%.
- PB baixo significa ter outro padrão mais frequente.
- Os padrões bioquímicos pouco frequentes terão menor probabilidade de isolamento.
- Não é aplicado quando se considera gênero, pois envolve várias espécies com diferentes padrões de testes (ex: *Salmonella* spp.).
- Valores seguidos do sinal positivo (+) ou negativo (neg) significa o percentual de cepas com resultado do teste positivo ou negativo. Ex: Lisina 75%+ = 75% das cepas são lisina positiva.
- V = valores >20% e <80% de reações positivas ou negativas; estas provas podem ser úteis para diferenciar duas espécies ou dois gêneros quando a reação só ocorre para uma delas. Ex.: uréia em relação a *E. coli* e *Citrobacter*. *E. coli* é negativa e *Citrobacter* variável. Se a reação encontrada for positiva, exclui-se *E. coli*.
- Pela importância clínica e epidemiológica, padrões não comuns de *Yersinia* e *Salmonella* spp. foram considerados, pois na prática a motilidade pode ser duvidosa e o H₂S pode ser falso-negativo.
- As provas destacadas com fundo cinza têm a finalidade de facilitar a busca de provas-chave na diferenciação bacteriana.
- Recomenda-se de rotina utilizar as provas do nível 1 que, para a maioria das bactérias da rotina, permite uma caracterização adequada. Quando houver necessidade usar as de nível 2.

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA SIMPLIFICADA DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS - NÍVEL DE COMPLEXIDADE 1

H₂S (gás sulfídrico) positivo, FA (fenilalanina) positivo

	Bactérias	PB#
Indol +	<i>Proteus vulgaris</i>	92%
Indol neg	<i>Proteus mirabilis</i>	94%

H₂S negativo , FA positivo

	Bactérias	Citrato	Uréia	PB#
Indol +	<i>Providencia</i> spp.	+	variável	88%
	<i>Morganella morganii</i>	neg	+	72%
Indol neg	<i>P. penneri</i>	neg	+	69%
	<i>Enterobacter</i> spp.	variável	neg	<16%

H₂S positivo, FA negativo, Indol positivo

Bactérias	Citrato	Motilidade	Urease	Lisina	Lac MC	PB#
<i>Citrobacter freundii</i>	78%+	89%+	variável	neg	+	25%
<i>Edwardsiella tarda</i>	neg	+	neg	+	neg	99%

Lac MC = lactose em Mac Conkey

H₂S positivo, FA negativo, Indol negativo

Bactérias	Urease	Citrato	Lisina	Motilidade	Gás	Sorotipagem	PB#
<i>Salmonella</i> spp.	neg	+	+	+	+	+	
<i>S. typhi</i>	neg	neg	+	+	neg	+	97%
<i>S. gallinarum</i> / <i>S. pullorum</i>	neg	neg	+	neg	variável	+	90%
<i>C. freundii</i>	variável	+	neg	+	+	neg	52%

H₂S negativo , FA negativo , Indol positivo, motilidade negativa

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Latose	Gás	Sorotipagem	PB#
<i>Y. enterocolitica</i> ¹	neg	75%+	neg	neg	neg	+ Yersinia	50%
<i>Shigella</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	+ Shigella	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	+	não	99%
<i>E.coli</i> inativa (rara)	neg	neg	variável	75% neg	neg	Invasora ²	80%

¹ - positivo à temperatura ambiente e negativa à 37°C

² - em coprocultura testar p/ *E. coli* invasora

H₂S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade positiva

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Lactose	Gás	PB#
<i>E. coli</i>	neg	neg	+	+	+	97%
<i>Citrobacter</i> spp.	+	variável	neg	variável	+	
<i>Aeromonas</i> spp. ¹	variável	neg	+	neg ²	variável	

¹ - oxidase positiva (verificar *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*)

Aeromonas Dnase positiva e *Plesiomonas* Dnase negativa

² - *Aeromonas caviae*: lisina negativa e lactose positiva

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Bactérias	Urease	Citrato	Lisina	Gás	Lactose	Comentário	PB#
<i>Shigella</i> spp. (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	+	+	+	+	+	Colônia mucóide	100%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	75%+	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>E. agglomerans</i> ³	neg	variável	neg	neg	variável	15% mot neg	9,6%

¹ - cepas isoladas do trato respiratório superior, especialmente nariz podem ser uréia negativas e bioquimicamente pouco ativas (citrato variável, lisina variável), denominadas *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*

² - motilidade positiva à temperatura ambiente

³ - pode ocorrer falsa motilidade negativa em meio semi-sólido e positiva em caldo

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato negativo

Bactérias	Lisina	Lactose	Sorotipagem	PB#
<i>Hafnia alvei</i>	+	neg	negativa	76%
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	neg	+	37%
<i>Salmonella paratyphi A</i>	neg	neg	+	90%
<i>E. agglomerans</i>	neg	variável	negativa	25%

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo, DNase e gelatinase negativas

Bactérias	Lisina	Urease	Lactose	Gás	Sorotipagem	PB#
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	neg	+	++	neg	95%
<i>Enterobacter cloacae</i>	neg	v	+	++	neg	95%
<i>Salmonella typhi</i>	+	neg	neg	neg	+	12%

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo, DNase e gelatinase positivas, *Serratia* spp.

Bactérias	Lisina	Urease	Lactose	Gás	Pigmento vermelho	PB#
<i>Serratia marcescens</i>	+	85% neg	neg	55% +	variável	95%
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	neg	90% neg	75% pos	neg	76%
<i>Serratia rubidae</i> ¹	55% +	neg	+	70% neg	variável	85%

¹ - raramente isolada

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA SIMPLIFICADA DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS - NÍVEL DE COMPLEXIDADE 2

H₂S positivo, FA positivo

	Bactérias	Ornitina	Sacarose	PB#
Indol positivos	<i>Proteus vulgaris</i>	neg	+	92%
	<i>Morganella morganii</i>	+	neg	20%

	Bactérias	Ornitina	Citrato	PB#
Indol negativos	<i>Proteus mirabilis</i>	+	variável (65%+)	94%
	<i>Proteus penneri</i>	neg	neg	30%

H₂S negativo, FA positivo

	Bactérias	Urease	Citrato	Sacarose	Ornitina
Indol negativos	<i>Proteus penneri</i>	+	neg	+	neg
	<i>Morganella morganii</i>	+	neg	neg	+
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	neg	+	75%+	neg
	<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	+	+	+

	Bactérias	Citrato
Indol positivos	<i>Morganella morganii</i>	neg
	<i>Providencia</i> spp.	+

H₂S positivo, FA negativo, Indol positivo

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Ornitina	Lactose	Sacarose
<i>Citrobacter freundii</i>	78%+	44%+	neg	neg	78%+	89%+
<i>Edwarsiella tarda</i>	neg	neg	+	+	neg	neg

H₂S positivo, FA negativo, Indol negativo

Bactérias	Uréia	Citrato	Lisina	Ornitina	Motibil.	Arabinos	Gás	Sorotip.
<i>Salmonella</i> spp.	neg	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	neg	neg	+	neg	+	neg	neg	+
<i>S. choleraesuis</i>	neg	25%+	+	+	+	neg	+	+
<i>S. paratyphi A</i>	neg	neg	neg	+	+	+	+	+
<i>S. gallinarum</i>	neg	neg	+	neg	neg	+	neg	+
<i>S. pullorum</i>	neg	neg	+	+	neg	+	+	+
Outras Salmonellas	neg	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	44%+	78%+	neg	neg	89%+	+	89%+	neg

Triagem rápida para principais bactérias H₂S positivas

Bactérias	PYR	Fenilalanina
<i>Salmonella</i> spp.	neg	neg
<i>Citrobacter</i> spp.	+	neg
<i>Proteus</i> spp.	neg	+

H₂S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade negativa

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Ornitina	Lactose	Gás	Sorotip.	PB#
<i>Y. enterocolitica</i> ¹	neg	75%+	neg	+	neg	neg	+	50%
<i>Shigella</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	+	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	neg	+	++	NI	99%
<i>E. coli inativa (rara)</i>	neg	neg	40%+	20%+	25%+	neg	invasora ²	80%

¹- positiva à temperatura ambiente e negativa a 37°C

²- em coprocultura testar para *E. coli* invasora

H₂S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade positiva

Bactérias	Citrato	Urease	Lisina	Ornitina	Lactose	Gás	PB#
<i>E. coli</i>	neg	neg	90%+	65%+	+	+	97%
<i>C. diversus (koseri)</i> ¹	+	75%+	neg	+	50%+	+	97%
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ¹	+	85%+	neg	+	35%+	+	97%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	neg	75%+	neg	+	neg	neg	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	50%+	20%+	neg	neg	40%+	20%+	16%
<i>Aeromonas</i> spp. ³	variável	neg	+ ⁴	+	neg	variável	

¹ - *C. koseri* = malonato positivo *C. amalonaticus* = malonato negativo

² - motilidade negativa a 35°C e positiva à temperatura ambiente

³ - oxidase positiva: *Aeromonas* é Dnase positiva e *Plesiomonas shigelloides* é Dnase negativa

⁴ - *Aeromonas caviae* é lisina negativa e lactose positiva

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Bactérias	Urease	Citrato	Lisina	Gás	Lactose	Comentário	PB#
<i>Shigella</i> spp. (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	Serotipagem +	>50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	Colônia Mucóide	100%
<i>Klebsiella</i> spp. ¹	neg	variável	variável	variável	variável	Mucóide	
<i>Citrobacter freundii</i>	v	78%+	neg	+	78%+	11% motil. neg	16%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	75%+	neg	neg	neg	neg	Serotipagem +	50%
<i>E. agglomerans</i> ³	neg	variável	neg	neg	variável	15% motil. neg	9,6%

¹- cepas isoladas do trato respiratório superior, especialmente nariz podem ser uréia negativas e bioquimicamente pouco ativas (citrato v, lisina v), denominadas *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*

²- motilidade + à temperatura ambiente

³- pode ocorrer falsa motilidade (negativa em meio semi-sólido e positiva em caldo)

H₂S negativo, FA negativa, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato negativo

Bactérias	Lisina	Ornitina	Lactose	Urease	Arabinos	Sorologia	PB#
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	neg	neg	+	neg	76%
<i>Salmonella typhi</i> ¹	+	neg	neg	neg	neg	+	
<i>Y. enterocolitica</i> ²	neg	+	neg	75%+	+	+	
<i>S. choleraesuis</i>	+	+	neg	neg	neg	+	
<i>S. paratyphi A</i>	neg	+	neg	neg	+	+	
<i>E. agglomerans</i>	neg	neg	40%+	20%+	+	neg	25%

¹- H₂S pode ser positivo no TSI com 48h

²- motilidade negativa à 35°C e positiva a 25°C

H₂S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa, Citrato positivo, DNase e gelatina negativas

Bactérias	Uréia	Fenil.	Lisina	Argin.	Ornit.	Malon.	Gás	Lactose	Escul.
<i>C. freundii</i>	44%+	0	0	67%+	0	11%+	89%+	78%+	0
<i>E. aerogenes</i>	2%+	0	98%+	0	98%+	95%+	100%+	95%+	98%+
<i>E. cloacae</i>	65%+	0	0	97%+	96%+	75%+	100%+	93%+	30%+
<i>E. agglomerans</i>	20%+	20%+	0	0	0	65%+	20%+	40%+	60%+
<i>E. gergoviae</i>	93%+	0	90%+	0	100%+	96%+	98%+	55%+	97%+
<i>E. sakazakii</i>	1%+	50%+	0	99%+	91%+	18%+	98%+	99%+	100%+

Versão simplificada para interpretação das provas da Lisina negativa

	Bactérias	Gás	Esculina	Arginina
Ornitina negativa	<i>Citrobacter freundii</i>	+	neg	variável
	<i>E. agglomerans</i>	neg	variável	neg

	Bactérias	Urease	Fenil.	Malonato	Esculina	Obs.
Ornitina positiva	<i>Enterobacter cloacae</i>	65%+	neg	75% +	30% +	+ comum
	<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	50%+	18% +	+	raro

Versão simplificada para interpretação das provas da Lisina positiva

Bactérias	Urease	Lactose
<i>E. aerogenes</i>	neg	+
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	variável

H₂S negativo, FA negativa, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo, Dnase e Gelatina positivas

Bactérias	Lisina	Ornitina	L-arabinose	Malonato	Motibilidade	Lactose
<i>Serratia marcescens</i>	99% +	99% +	neg	neg	+	neg
<i>S. marcescens biog</i> ¹	55% +	65% +	neg	neg	neg	neg
<i>Serratia liquefaciens</i>	95% +	95% +	+	neg	+	neg
<i>Serratia rubidae</i>	55% +	neg	+	+	+	+

CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA (%)

Bactérias	Indol	Citr.	H₂S	Uréia	Fenil.	Lisina	Argin.	Ornit.	Motil.
<i>Citrobacter freundii</i>	33	78	78	44	0	0	67	0	89
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	99	99	0	75	0	0	80	99	95
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	100	95	5	85	0	0	85	95	95
<i>Edwardsiella tarda</i>	99	1	100	0	0	100	0	100	98
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	0	2	0	98	0	98	97
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	100	0	65	0	0	97	96	95
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	0	20	20	0	0	0	85
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	99	0	93	0	90	0	100	90
<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	99	0	1	50	0	99	91	96
<i>Escherichia coli</i>	98	1	1	1	0	90	17	65	95
<i>Escherichia coli inativa</i>	80	1	1	1	0	40	3	20	5

<i>Shigella dysenteriae</i>	45	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	50	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Shigella boydii</i>	25	0	0	0	0	0	18	2	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	2	98	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	10	0	4	0	100	6	98	85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	98	0	95	0	98	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	95	0	90	1	99	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	30	0	10	0	40	6	3	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> grupo	95	0	20	95	95	v	0	95	v
<i>Proteus mirabilis</i>	2	65	98	98	98	0	0	99	95
<i>Proteus vulgaris</i>	98	15	95	95	99	0	0	0	95
<i>Proteus penneri</i>	0	0	30	100	99	0	0	0	85
<i>Providencia rettgeri</i>	99	95	0	98	98	0	0	0	94
<i>Providencia stuartii</i>	98	93	0	30	95	0	0	0	85
<i>Providencia alcalifaciens</i>	99	98	0	0	98	0	0	0	96
<i>Salmonella</i> spp.	1	95	95	1	0	98	70	97	95
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	97	0	0	98	3	0	97
<i>Salmonella cholerasuis</i>	0	25	50	0	0	95	55	100	95
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0	0	10	0	0	0	15	95	95
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	100	0	0	90	10	1	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	100	10	95	0
<i>Salmonella outas</i>	1	90	100	0	0	99	70	99	99
<i>Serratia marcescens</i>	1	98	0	15	0	99	0	99	97
<i>Serratia marcescens</i> bio	0	30	0	0	0	55	4	65	17
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	90	0	3	0	95	0	95	95
<i>Serratia rubidaea</i>	0	95	0	2	0	55	0	0	85
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	0	0	75	0	0	0	95	2

CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA (%)

Bactérias	Gelatina	Malon.	Gás glicose	Lactose	Sacarose	Escul.	DNAase
<i>Citrobacter freundii</i>	0	11	89	78	89	0	0
<i>Citrobacter diversus</i> (koseri)	0	95	98	50	40	1	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	1	97	35	9	5	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	100	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	100	95	100	98	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	75	100	93	97	30	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	65	20	40	75	60	0

<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	96	98	55	98	97	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0	18	98	99	100	100	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	95	95	50	35	0
<i>Escherichia coli inativa</i>	0	0	5	25	15	5	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	0	0	3	1	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	2	1	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	50	98	5	10	7	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	93	97	98	99	99	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	98	97	100	100	100	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	3	50	30	20	80	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	95	0	0	75	30	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	0	1	90	1	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	90	2	96	2	15	0	50
<i>Proteus vulgaris</i>	91	0	85	2	97	50	80
<i>Proteus penneri</i>	50	0	45	1	100	0	40
<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	10	5	15	35	0
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	2	50	0	10
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0	85	0	15	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	96	1	1	5	2
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella cholerasuis</i>	0	0	95	0	0	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	99	0	0	0	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	10
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	0	0
<i>Salmonella outas</i>	1	V	100	V	1	0 ou 15	1
<i>Serratia marcescens</i>	90	3	55	2	99	95	98
<i>Serratia marcescens bio</i>	30	0	0	4	100	96	82
<i>Serratia liquefaciens</i>	90	2	75	10	98	97	85
<i>Serratia rubidae</i>	90	94	30	100	99	94	99
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	5	5	95	25	5

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, encontram-se conjuntos de amostras bacterianas bioquimicamente homogêneas e, sorologicamente relacionadas, que constituem os gêneros e, segundo alguns critérios, podem se dividir em espécies.

As amostras relacionadas bioquimicamente são divididas em subgrupos ou tipos, por critério sorológico, de acordo com a presença dos antígenos: somático (**O**), flagelar (**H**) e de envoltório ou

cápsula (**K**). Desse modo, os sorotipos são divisões baseadas no relacionamento antigênico, enquanto os biotipos são amostras do mesmo sorotipo que diferem em características bioquímicas.

Em atividades de rotina de Bacteriologia Clínica, a identificação ou confirmação sorológica é feita apenas com germes comprovadamente patogênicos e de importância epidemiológica como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* *Yersinia enterocolitica* e mesmo assim utilizando-se esquemas simplificados, através do seguinte procedimento técnico:

- Preparar uma suspensão bastante densa (aspecto leitoso), da bactéria a ser testada, utilizando solução salina a 0,85%. A massa bacteriana é proveniente do Ágar TSI usado na identificação bioquímica ou, de preferência, em ágar nutriente inclinado após repique para obtenção de massa de germes.
 - Colocar a salina sobre o crescimento bacteriano ocorrido na superfície inclinada do meio;
 - Agitar o tubo após alguns minutos de modo a obter a suspensão bacteriana;
 - Bactérias em fase rugosa tendem a se auto-aglutinar, e não devem ser utilizadas na classificação sorológica.
- Sobre uma lâmina limpa misturar uma gota do anti-soro conhecido e da suspensão bacteriana a ser testada, e, com movimentos circulares, tornar a mistura bastante homogênea continuando o movimento durante um ou no máximo dois minutos. O aparecimento de aglutinação, nesse intervalo de tempo, indica positividade da reação.
- Algumas vezes, é necessário o aquecimento da suspensão bacteriana em banho-maria fervente, durante 15 minutos, com finalidade de eliminar estruturas mais externas da célula que têm ação interferente na reação. Após o resfriamento da suspensão, repetir o teste. Caso ocorra a aglutinação, confirmar a prova.

IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELLA

No gênero *Salmonella* existe uma grande quantidade de sorotipos, que não são mais considerados como espécies, e sua identificação sorológica completa e detalhada é uma tarefa restrita aos denominados Laboratórios de Referência. Para identificação rotineira no laboratório clínico utilizam-se basicamente três antisoros:

- a) Anti-*Salmonella* polivalente somático (**Grupos A,B,C,D,E**)
- b) Anti-*Salmonella* somático, Grupo D (***S. typhi***)
- c) Anti-*Salmonella*, anti **Vi**

Quando o denominado antígeno de virulência (Vi) está presente, poderá bloquear a aglutinação do antígeno somático do grupo D (*Salmonella typhi*). Desse modo, a suspensão deverá ser aquecida em banho-maria fervente e testada novamente com os três anti-soros citados, dando o resultado abaixo no caso de *Salmonella typhi*. A partir de uma reação positiva feita apenas com o antígeno somático polivalente, existe condição de confirmar a amostra como sendo do gênero *Salmonella*, sem especificar o sorotipo ou sorovar.

Antisoros	Antígeno vivo	Antígeno aquecido
Anti-soro poli somático	+	+
Grupo D somático	neg	+
Anti Vi	+	neg

Após a identificação bioquímica e aglutinação com soro polivalente, as amostras poderão ser testadas com os soros A,B,C,D,E monovalentes. A bactéria pertencerá ao sorogrupo em cujo soro houver aglutinação. Se a reação for negativa deve-se aquecer a metade da suspensão em banho-maria fervente e repetir o teste. A metade não aquecida deverá ser utilizada para determinação de antígenos flagelares. A identificação até sorotipos poderá ser feita com auxílio dos soros flagelares (a,b,c,d,i,1,2,5), e através de sua utilização é possível identificar as seguintes amostras:

Grupo Sorológico	Espécie Bacteriana
Grupo O2 (A)	<i>Salmonella paratyphi A</i>
Grupo O4 (B)	<i>Salmonella paratyphi B</i> e <i>S. typhimurium</i>
Grupo O7 (C1)	<i>Salmonella paratyphi C</i> e <i>S. cholerae suis</i>
Grupo O5 (D1)	<i>Salmonella typhi</i>

IDENTIFICAÇÃO DE SHIGELLA

O gênero *Shigella* está constituído de apenas quatro sorogrupos, que são identificados sorologicamente, de maneira simplificada, com a utilização de anti-soros polivalentes. Excepcionalmente, utiliza-se apenas o antisoro monovalente de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (bacilo de Shiga), por ser o mais patogênico.

Grupo Sorológico	Espécie Bacteriana	Sorotipos
Grupo A	<i>Shigella dysenteriae</i>	13 sorotipos
Grupo B	<i>Shigella flexneri</i>	06 sorotipos
Grupo C	<i>Shigella boydii</i>	18 sorotipos
Grupo D	<i>Shigella sonnei</i>	01 sorotipo

As culturas suspeitas deverão ser testadas primeiramente com os soros contra *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, que representam mais de 95% das amostras de *Shigella* isoladas em nosso meio. Caso não haja aglutinação, prosseguir com os outros soros.

Não ocorrendo aglutinação, é possível que a cultura seja rica em antígenos de superfície que geralmente impedem o contato do soro com o antígeno somático **O**. Estes antígenos devem ser destruídos pelo aquecimento da suspensão bacteriana por 15 minutos em banho-maria fervente, procedimento que pode ser adotado como de rotina na sorologia desse gênero.

IDENTIFICAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI

As amostras de *Escherichia coli* que causam diarreia pertencem a três grupos principais:

- Enteropatogênicas (**EPEC**)
- Enterotoxigênicas (**ETEC**)
- Enteroinvasoras (**EIEC**)

Não existe nenhuma prova bioquímica que possa, seguramente, distingui-las entre si ou de outros tipos de *E. coli* pertencentes à flora normal do intestino. As amostras EPEC e EIEC são identificadas por provas de sorotipificação rotineira, enquanto as amostras ETEC são identificadas apenas mediante provas especiais de produção de toxinas, realizadas somente em laboratórios de referência ou de pesquisa.

Soro Anti *E. coli* Enteropatogênica Clássica (EPEC)

Polivalente A	anti 026, 055, 0111, 0119
Polivalente B	anti 0114, 0125, 0142, 0158
Polivalente C	anti 086, 0126, 0127, 0128

A sorotipificação pode ser feita, utilizando-se a mesma técnica descrita para outras enterobactérias. Um melhor resultado é obtido, repicando cerca de cinco colônias características a partir do Ágar BEM ou Mac Conkey, para um tubo contendo Ágar Nutriente Inclinado, com finalidade de obter massa de

germes. É feita então uma suspensão bacteriana em solução salina, a qual será testada utilizando anti-soros polivalentes, abrangendo os sorotipos mais prevalentes na população.

Soro Anti E. coli Enteroinvasora (EIEC)

Polivalente A	anti 028ac, 029, 0136, 0144, 0152
Polivalente B	anti 0112ac, 0124, 0143, 0164, 0167

Soro Anti E. coli O 157 (EHEC)

Utilizar o soro para O157:H7

Observações importantes:

- Bactérias isoladas com o mesmo padrão de provas de materiais nobres em surtos de infecção hospitalar, ou isoladas de infecções da comunidade que possam suspeitar de um surto, ou pela gravidade da doença, ou por um padrão não esperado de resistência, devem ser remetidas ao Laboratório de Referência (LACEN/Adolfo Lutz) para melhor caracterização.
- Bactérias que não se enquadram nos padrões definidos acima, recorrer a testes suplementares ou usar kits com maior número de provas ou em caso de importância clínica (descritos acima) enviar ao Laboratório de Referência.

4. BASTONETES NÃO FERMENTADORES

INTRODUÇÃO

Os bacilos Gram negativos classificados como não fermentadores (BNFs) são microrganismos aeróbios, não esporulados, que se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de fermentação, degradando-os pela via oxidativa.

A identificação dos BNFs sempre foi um desafio para os laboratórios de rotina em microbiologia, considerando que a maioria deles não realiza este tipo de identificação, ou o faz de maneira elementar em virtude da pouca incidência em amostras ambulatoriais, assim como pela complexidade e elevado custo dos esquemas completos de identificação.

A caracterização deste grupo de bactérias é de grande importância nos casos de infecção hospitalar. Embora a sua incidência, mesmo em hospitais, seja pequena quando comparada a outros agentes etiológicos, geralmente eles apresentam resistência elevada a vários antibióticos e são capazes de causar infecções graves. Estas bactérias colonizam e causam infecções, em especial, em pacientes graves oriundos de CTI e submetidos à procedimentos invasivos, sendo importante classificá-los até o nível de gênero e espécie.

O número de bactérias não fermentadoras conhecidas é muito grande. Foram selecionadas aquelas consideradas na atualidade de maior importância clínica (*) e as demais para diagnóstico diferencial entre si.

BNFs de importância clínica consideradas neste capítulo*:

- *Acinetobacter* spp.*
- *Achromobacter* spp.
- *Burkholderia cepacia* *
- *Methylobacterium* spp.
- *Pseudomonas aeruginosa* *
- *Pseudomonas luteola*
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas pseudomallei* *
- *Stenotrophomonas* spp.*
- *Sphingobacterium* spp.
- *Alcaligenes* spp.*
- *Bordetella bronchiseptica*
- *Chryseobacterium (Flavobacterium)* spp.*
- *Moraxella* spp.*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas oryzihabitans*
- *Pseudomonas stutzeri*
- *Roseomonas* spp.
- *Shewanella* spp.
- *Sphingomonas paucimobilis*

Testes necessários para a identificação de rotina dos BNFs

- Tubo de OFglicose (com vaselina)
- Tubo de OFglicose (sem vaselina)
- Tubo com lisina
- Tubo controle de aminoácidos
- Tubo ágar citrato
- Tubo ágar uréia
- Tubo com ágar esculina
- Tubo com TSI
- Tubo com gelatina
- Tubo com caldo NaCl 6,5%
- Disco de oxidase
- Disco de PYR
- Tubo com arginina
- Caldo TSB para motilidade em lâmina
- Caldo TSB crescimento 42°C
- Tubo de caldo indol
- Disco de polimixina
- Placa de Mac Conkey
- Placa de DNase

SEMEADURA, LEITURA E INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

A partir de colônias isoladas em cultura pura com 24 horas de crescimento, nos meios de inoculação primária, deve-se proceder a realização das técnicas de identificação e diferenciação dos BNFs:

PROVAS	SEMEADURAS	LEITURA E INTERPRETAÇÃO
Disco de oxidase	<ul style="list-style-type: none">- Retirar 2-3 colônias com alça.- Esfregar sobre a fita ou disco teste; pode umedecer o papel com 1 gota de salina estéril.	<ul style="list-style-type: none">- A leitura é feita em 15 a 20 segundos.- A cor violeta forte aparece rapidamente. Após este intervalo, cores violeta-pálido são falso positivos. A <i>Burkholderia cepacia</i> pode dar reação fraca.

Tubo de OF glicose (com e sem vaselina)	<ul style="list-style-type: none"> - Picar com agulha até o fundo do tubo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentador: dois tubos ficam amarelos (ácido) - Oxidativo: tubo sem vaselina amarelo tubo com vaselina verde - Inerte ou alcalino: dois tubos não mudam de cor (inerte) ou o tubo sem vaselina fica azulado (alcalino). Aguardar, no mínimo, 72h para definir como inerte, pois pode ocorrer a oxidação tardia ou lenta.
Tubo com pedaço de filme e gelatina	<ul style="list-style-type: none"> - Inocular 2-3 colônias na salina. - Deixar o fragmento imerso. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incubar 30°C, se negativo, aguardar no mínimo 72h. Se positivo, ocorre precipitado cinza no fundo do tubo.
Placa de DNase	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 a 3 colônias em "spot" (círculo de 1 cm de diâmetro). 	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar ácido clorídrico e aguardar 5 minutos. - Observar a presença de halo transparente em volta do inóculo positivo enquanto o restante do meio fica leitoso. - Se negativo, repetir o teste com leitura em 72h.
Tubo com lisina, arginina, controle de aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> - Usar inóculo denso; pode adicionar 2 ml de vaselina líquida no tubo com lisina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Comparar os tubos testes dos aminoácidos com o controle negativo. - tubo controle negativo deve ficar azul esverdeado pálido e as provas positivas ficam de cor púrpura. - Se negativo, aguardar até 5 dias.
Uréia	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com agulha inóculo denso na superfície do meio. 	<ul style="list-style-type: none"> - A cor rosa forte aparece em todo o meio após 24 a 72 h de incubação; uma ligeira mudança de cor rósea no ápice, que não progride com maior tempo de incubação, é considerado negativo. - <i>Bordetella bronchiseptica</i>: reação positiva em 4 h.
Citrato	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com agulha na superfície do meio. 	<ul style="list-style-type: none"> - A cor azul forte aparece no pico, e com maior incubação estende-se a todo o meio.
Caldo TSB crescimento 42°C	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ocorre turbidez no meio ou é nítido o aumento da densidade bacteriana. - Ideal comparar com controle mantido a temperatura ambiente.
Caldo TSB motilidade	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agitar o tubo e com uma pipeta com ponteira estéril ou alça bacteriológica estéril. - retirar uma gota e depositar sobre uma lâmina. - Cobrir a gota com uma lamínula e levar ao microscópio. Observar com aumento de 400 vezes (ocular 10x e objetiva 40). - A presença de bactérias cruzando o campo em diferentes direções é significativo de motilidade positiva; movimentos vibratórios fracos = negativo (movimento browniano). Quando o movimento de todas as bactérias é numa mesma direção, provavelmente é o movimento do líquido entre a lâmina e a lamínula. - Verificar a motilidade em temperaturas de 37°C e 20°C (ambiente).
Tubo com caldo NaCl 6,5%	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 a 3 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - A presença de turbidez e mudança de cor indicam crescimento
Tubo com ágar esculina	<ul style="list-style-type: none"> - Semear 2 a 3 colônias na superfície do meio. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ocorre precipitado negro intenso nas provas positivas a partir de 6 horas de incubação até 48 h - Cor castanho escuro é prova negativa.
Tubo de caldo indol	<ul style="list-style-type: none"> - Inocular 2 colônias no caldo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar 5 gotas de xilol e agitar bem o tubo. - Adicionar 5 gotas do reagente de Erlich ou Kovacs. - Observar a presença de anel púrpura-pálido ou intenso que revelam prova positiva.
Disco de polimixina	<ul style="list-style-type: none"> - Fazer antibiograma em Mueller Hinton. - Colocar o disco. 	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer halo em torno do disco significa sensibilidade.

Disco de PYR	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar o disco sobre colônias de crescimento recente ou fazer suspensão densa. - Depositar 3 a 4 gotas sobre o disco de PYR. - Incubar durante 4 horas numa placa vazia com umidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar o disco teste em contato com o crescimento bacteriano. - Colocá-lo sobre uma lâmina. - Depositar uma gota do reagente que acompanha o teste. - A presença de cor alaranjada é prova positiva; mantendo a cor amarela é prova negativa. - Recomenda-se testar controles positivo e negativo.
Placa de Mac Conkey	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com alça 1 colônia isolada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Crescimento deve ocorrer entre 1 a 3 dias.
TSI	<ul style="list-style-type: none"> - Semear com agulha picando até o fundo do tubo e na superfície do ágar inclinado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fermentador: presença de cor amarela apenas na base ou no ápice e na base - Com ou sem H₂S e gás: precipitado preto e bolhas. - Não fermentador: permanece vermelho (alcalino) no ápice e na base.

PROCEDIMENTOS PARA A IDENTIFICAÇÃO

No caso de isolar uma bactéria que não foi ainda comprovada como não fermentadora da glicose, seguir as seguintes etapas com a colônia isolada:

Gram e Oxidase: observar se há pigmento da colônia crescida (amarelo, róseo, cor metálica).

RESULTADO DO GRAM E OXIDASE

Gram Positivo:

- Procurar a identificação de cocos e bacilos Gram positivos

Gram negativo:

- Coco Gram negativo, oxidase positivo, identificar como *Neisseria* spp. ou seguir para a Tabela 2
- Coco Gram negativo, oxidase negativo, seguir para Tabela 1

Bacilo Gram negativo, oxidase negativo:

- Semear Fenilalanina, Citrato, Uréia (ou EPM MILI ou IAL)
- Semear OF glicose e Caldo motilidade – seguir [Resultado OF 1](#)

Bacilo Gram negativo, oxidase positivo:

- Semear OF Glicose e Caldo motilidade – seguir [Resultado OF 2](#)

RESULTADO DO OF

1. Bacilo (cocobacilo) Gram negativo oxidase negativo

OF Glicose fermentador:

- Fazer a identificação com as provas realizadas, visto ser uma enterobactéria.
- Vide capítulo enterobactérias para interpretação dos resultados.

OF não fermentador:

- motilidade negativa: Tabela 1
- motilidade positiva: Tabela 3

2. Bacilo Gram negativo oxidase positiva:

- OF Glicose fermentador: pesquisar *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*
- OF Glicose não fermentador:
 - se pigmento rosa, seguir Tabela 7
 - motilidade negativa e pigmento amarelo, seguir Tabela 4
 - motilidade positiva: se TSI com H₂S segue Tabela 5a e 5b; se OF glicose Oxidativo segue Tabela 5; se OF glicose Inerte, seguir Tabela 6

TABELAS DE IDENTIFICAÇÃO DOS BNFS

Tabela 1. Coco-bacilos ou cocos Gram negativo, Oxidase negativa e Motilidade negativa

Microrganismos	OF-glicose	Cresc. 42°C	Citrato	Gelatina
<i>A. baumannii</i>	O	+	+	neg
<i>A. calcoaceticus</i>	O	neg	+	neg
<i>A. haemolyticus</i>	Inerte/oxidativo	neg	+	+
<i>A. lwoffii</i>	inerte	neg	neg	neg

Prova opcional

Microrganismos	Hemólise *
<i>A. baumannii</i>	neg
<i>A. calcoaceticus</i>	neg
<i>A. haemolyticus</i>	+
<i>A. lwoffii</i>	neg

* hemólise em ágar sangue

Tabela 2. Cocos Gram negativo, Oxidase positivo, Motilidade negativa, OF-Gli inerte

Microrganismos	Urease	Gelatina	DNase	Mac Conkey
<i>Moraxella(B) catarrhalis</i>	neg	neg	+	neg
<i>Moraxella canis</i>	neg	neg	+	+
<i>M. fenilpiruvica/ureolytica</i>	+	neg	neg	+
<i>Moraxella lacunata</i>	neg	+	neg	neg
<i>Moraxella spp. *</i>	neg	neg	neg	variável

* *Moraxella spp.*: *nonliquefaciens*, *lincolnii*, *osloensis*, *atlantae* e *Oligella urethralis*

Tabela 3. Bacilos Gram negativo, Oxidase negativa, Motilidade positiva, OF-Gli oxidativo ou inerte

Microrganismos	Arginina	DNase	Lisina	Polimixina *
<i>Pseudomonas luteola</i>	+	neg	neg	sensível
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	neg (14+)	neg	neg	sensível
<i>B. cepacia</i>	neg	neg	80%+	resistente
<i>S. maltophilia</i>	neg	+	93%+	resistente

* Fazer antibiograma com polimixina

Provas opcionais

Microrganismos	Esculina	PYR	Imipenem *
<i>Pseudomonas luteola</i>	+	+	sensível
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	neg	+	sensível
<i>B. cepacia</i>	variável	neg	variável
<i>S. maltophilia</i>	variável	neg	resistente

* Fazer antibiograma com Imipenem

Tabela 4. Oxidase positiva, Motilidade negativa e OFG Oxidativo, Bacilos com pigmento amarelo e Crescimento em MC variável

Microrganismos	Indol	DNase	Polimixina	Uréia
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	+	+	resistente	neg
<i>C. indologenes</i>	+	neg	resistente	neg
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	neg	neg	sensível	neg
<i>Sphingobacterium</i> spp. *	neg	variável	resistente	+

* *S. multivorum*, *S. spiritivorum*

Tabela 5a. Bacilos Gram negativo, Oxidase positiva, Motilidade positiva, OF GLI oxidativo - vide fluxograma para facilitar interpretação

Microrganismos	Polimixina	Lisina	Arginina	NaCl 6,5%	Gelatina	42°C	Característica
<i>A. xiloxidans</i>	sensível	neg	neg	neg	neg	+ 86	
<i>P. aeruginosa</i>	sensível	neg	+		82	+	pigmento
<i>P. fluorescens</i>	sensível	neg	+		+	neg	
<i>P. putida</i>	sensível	neg	+		neg	neg	
<i>P. stutzeri</i>	sensível	neg	neg	+	neg	variável	seca
<i>B. pseudomallei</i>	resistente	neg	+		+79%	+	
<i>B. cepacia</i>	resistente	80%+	neg		20%+	83%+	
<i>S. paucimobilis</i> *	sensível	neg	neg		+	neg	pigm. amarelo
<i>Shewanella</i> spp.	sensível	neg	neg	variável	variável	variável	

* Mot positiva = Temperatura ambiente

Provas complementares ^{1, 2}

Microrganismos	Esculina *	PYR *	Microrganismos	Esculina *	PYR *
<i>A. xiloxidans</i>	neg	+	<i>B. pseudomallei</i>	variável	neg
<i>P. aeruginosa</i>	neg	variável	<i>B. cepacia</i>	variável	neg
<i>P. fluorescens</i>	neg	variável	<i>S. paucimobilis</i> *	+	25+
<i>P. putida</i>	neg	neg	<i>Shewanella</i> spp.	neg	+
<i>P. stutzeri</i>	neg	neg			

* provas da esculina e PYR úteis apenas para diferenciar as bactérias lisina e arginina negativas

Tabela 5b. Bacilos Gram negativos não fermentadores, Oxidase positiva, Motilidade positiva, com H₂S no TSI, OF Glicose variável, DNase positiva

Bactéria	Cresc. 42°C	NaCl 6,5%
<i>Shewanella putrefaciens</i>	neg	neg
<i>Shewanella alga</i>	+	+

Fluxograma Auxiliar para Tabela 5

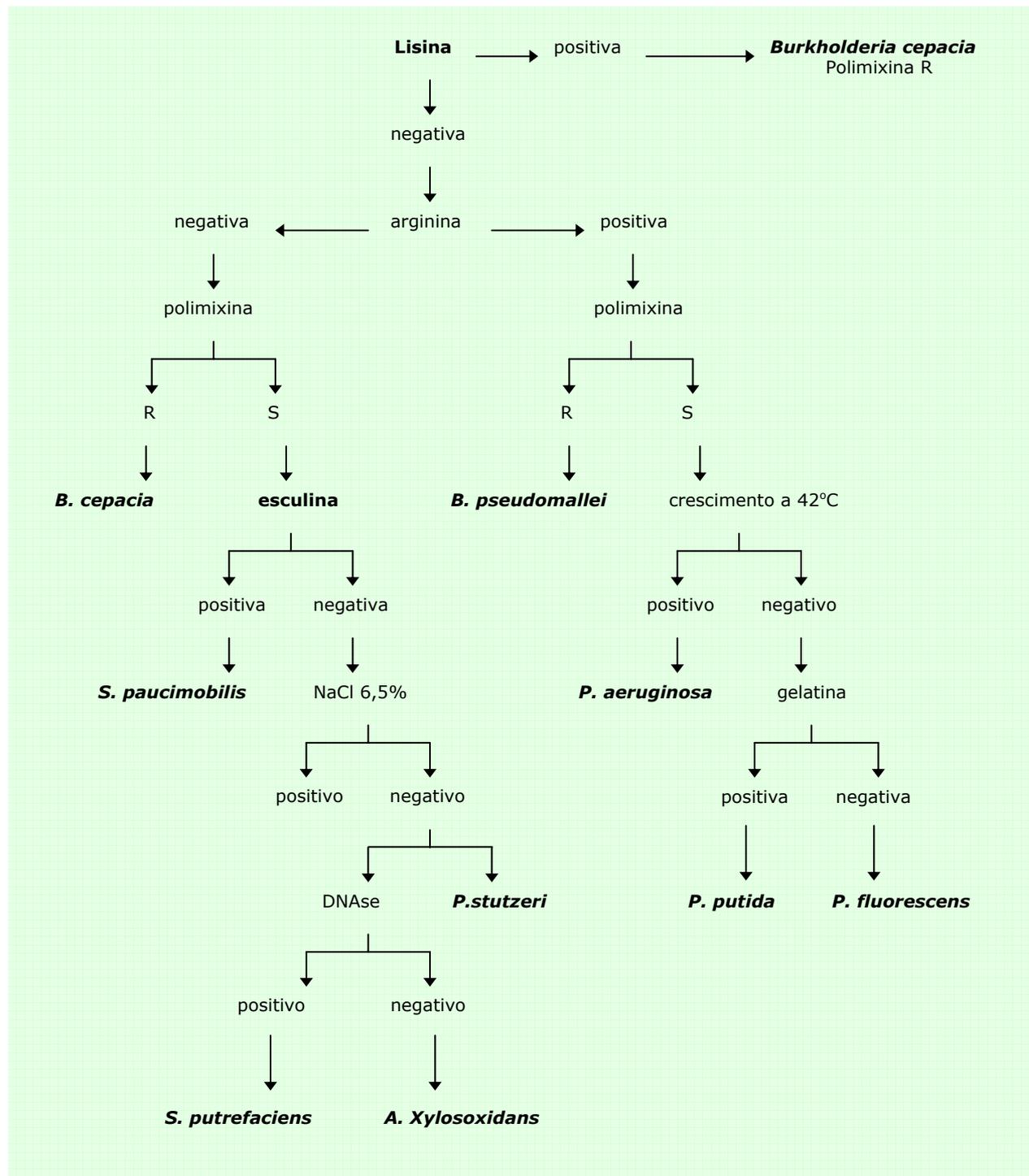


Tabela 6. Bacilos Oxidase positiva, Motilidade positivo, OF-Gli alcalino - incubar 72 h.

Microrganismos	Uréia	NaCl 6,5%	DNase
<i>A. denitrificans</i>	variável	neg	neg
<i>Alcaligenes faecalis</i>	neg	+	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	++	neg	neg
<i>S. malthophilia</i> *	neg	78% neg	+

*raramente pode ser oxidase positiva

Prova complementar 2

Microrganismos	PYR
<i>A. denitrificans</i>	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	neg
<i>S. malthophilia</i>	neg

Tabela 7. Bacilos e coco-bacilos Gram negativos não fermentadores, Oxidase positiva, OF Glicose variável, com pigmento róseo (1)

Microrganismos	Motilidade	Morfologia	Urease	Mac Conkey	Cresc. 42°C	Obs.
<i>Methylobacterium</i> spp.	+	bacilos	+	neg	neg	colônia seca coral
<i>Roseomonas</i> spp.	variável	Coco-bacilos	+	+	+	colônias mucóides rosadas

TABELAS DE CONSULTA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NÃO FERMENTADORES

Oxidase e motilidade negativos

Microrganismos	OXI	MOT	Morf.	OF-G	Cresc. a 42°C	CIT	MAL	GEL	HEM
<i>A. baumannii</i>	neg	neg	coco	O	+	+	+	neg	neg
<i>A. calcoaceticus</i>	neg	neg	coco	O	neg	+	+	neg	neg
<i>A. haemolyticus</i>	neg	neg	coco	Inerte/oxidativo	neg	+	neg	+	+
<i>A. lwoffii</i>	neg	neg	coco	inerte	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	neg	neg	coco	Inerte/oxidativo	neg	+	variável	variável	variável

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia CIT = citrato MALO = malonato GEL = gelatina
 OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson HEM = hemólise em ágar sangue

Oxidase negativo e Motilidade positiva

Microrganismos	Oxidase	Motilidade	Morfologia	OF-Glicose	Imipenem
<i>P. luteola</i>	neg	+	bacilo	oxidativo	sensível
<i>P. oryzihabitans</i>	neg	+	bacilo	oxidativo	sensível
<i>S. maltophilia</i>	neg	+	bacilo	85% oxid.	resistente
<i>B. cepacia</i>	14% neg	+	bacilo	oxidativo	resistente

Microrganismos	Esculina	Dnase	Lisina	Argina	Mac Conkey	42°C
<i>P. luteola</i>	+	neg	neg	+	+	94%+
<i>P. oryzihabitans</i>	neg	neg	neg	14%+	+	33%+
<i>S. maltophilia</i>	39%+	+	+	neg	+	48%+
<i>B. cepacia</i>	63%+	neg	80%+	neg	+	83%+

Oxidase positiva, Motilidade negativa, OF-Glicose oxidativo

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF-G	Uréia	Indol	DNase	MC	Poli
<i>C. meningosepticum</i>	+	neg	bacilo	oxidativo lento	neg	+	+	variável	resistente
<i>C. indologenes</i>	+	neg	bacilo	oxidativo lento	neg	+	neg	variável	resistente
<i>S. paucimobilis</i> ¹	+	Neg ²	bacilo	oxidativo	neg	neg	neg	variável	sensível
<i>Sphingobacterium</i> spp.	+	neg	bacilo	oxidativo	var	neg	variável	variável	resistente

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia MC = Mac Conkey Poli = polimixina

OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson

¹ pode ser motilidade positiva a 20°C

² a 37°C

Oxidase positiva, Motilidade negativa, OF-Glicose inerte e cocóide

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF-G	Uréia	GEL	DNase	MC
<i>M. catarrhalis</i>	+	neg	coco	inerte	neg	neg	+	neg
<i>M. canis</i>	+	neg	coco	inerte	neg	neg	+	+
<i>M. fenilpiruvica / ureolytica</i>	+	neg	coco	inerte	+	neg	neg	+
<i>M. lacunata</i>	+	neg	coco	inerte	neg	+	neg	neg
<i>Moraxella</i> spp. * raras	+	neg	coco	inerte	neg	neg	neg	variável

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia MC = Mac Conkey GEL = gelatina

OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson

* *Moraxella* spp.: *nonliquefaciens*, *lincolnii*, *osloensis*, *atlantae* e *Oligella urethralis*

Oxidase positiva, Motilidade positiva e OF-Glicose inerte ou alcalino

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF-G	MC	Uréia	CIT	Nat\ ito	Nit\ gás	Cresc. 42°C
<i>A. denitrificans</i>	+	+	bacilo	alcalina	+	nt		+	+	
<i>A. piechaudii</i>	+	+	bacilo	alcalina	+	neg		+	neg	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	bacilo	alcalina	+	neg		neg	+	
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	coco-bacilo	alcalina	+	++		+	neg	
<i>Comamonas</i> spp.	+	+	bacilo	inerte	+	neg	+	+	neg	variável
<i>P.pseudoalcaligenes</i>	+	+	bacilo	inerte	+	neg	variável	+	neg	+
<i>P. alcaligenes</i>	+	+	bacilo	inerte	+	neg	variável	54+	neg	neg

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia MC = Mac Conkey CIT = citrato
 OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson
 nt= não testado (não citado na literatura)

Oxidase positiva, Motilidade positiva e OF-Glicose oxidativo

Microrganismos	Oxidase	Motilidade	Morfologia	OF-Gli	Cresc. 42°C
<i>A. xiloxidans</i>	+	+	bacilo	oxidativo	nt
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	bacilo	oxidativo	+
<i>P. fluorescens</i>	+	+	bacilo	oxidativo	neg
<i>P. mendocina</i> (rara)	+	+	bacilo	oxidativo	+
<i>P. putida</i>	+	+	bacilo	oxidativo	neg
<i>P. stutzeri</i>	+	+	bacilo	oxidativo	69
<i>S. paucimobilis</i>	+	+	bacilo	oxidativo	nt
<i>B. cepacia</i>	86% +	+	bacilo	oxidativo	83% +
<i>B pseudomallei</i>	+	+	bacilo	oxidativo	+
<i>S. putrefaciens</i>	+	+	bacilo	oxidativo	V

nt= não testado (não citado na literatura)

Microrganismos	Gelatina	Esculina	Polimixina	Mac Conkey	Lisina	Arginina
<i>A. xiloxidans</i>	nt	neg	sensível	+	nt	variável
<i>P. aeruginosa</i>	82% +	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. fluorescens</i>	+	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. mendocina</i> (rara)	neg	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. putida</i>	neg	neg	sensível	+	neg	+
<i>P. stutzeri</i>	neg	neg	sensível	+	neg	neg
<i>S. paucimobilis</i>	nt	+	sensível	variável	nt	neg
<i>B. cepacia</i>	20% +	63% +	resistente	+	80% +	neg
<i>B pseudomallei</i>	79% +	59% +	resistente	+	neg	+
<i>S. putrefaciens</i>	variável	neg	sensível	+	neg	neg

nt= não testado (não citado na literatura)

Bactérias não fermentadoras com pigmento rosa

Microorganismos	OXI	MOT	Morf	OF-Gli	Uréia	Mac Conkey	Cresc. 42°C	Obs.
<i>Methylobacterium</i> spp.	+	+	bacilo	variável	+	neg	neg	Colônia seca coral, bacilos com vacúolos
<i>Roseomonas</i> spp.	+	variável	coco-bacilo	variável	+	+	+	Colônias mucóides rosadas cocobacilos

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia

5. BACIOS CURVOS OU ESPIRALADOS

INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta os principais bacilos curvos ou espiralados de importância clínica, relacionados às principais patologias, fontes de infecção e recursos diagnósticos para sua caracterização. Por se tratar de agentes raros, com exceção dos *Campylobacter* spp., não serão abordados em profundidade, devendo o microbiologista encaminhar a cepa isolada para Laboratório de Referência ou consultá-lo sobre recursos disponíveis para tentativa de isolamento.

PRINCIPAIS BACTÉRIAS CURVAS OU ESPIRALADAS

Agente	Doença	Reservatório	Transmissão
<i>Arcobacter</i> spp.	Bacteremia gastroenterite	Gado, humanos	Alimentos ¹
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Doença de Lyme	Roedores	Carrapatos
<i>Borrelia recurrentis</i>	Febre recorrente epidêmica	Humanos	Sarna (<i>P.humanus</i>)
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	Gastroenterite	Alimentos contaminados	Alimentos ¹
<i>Campylobacter fetus</i>	Bacteremia, infecção extraneointestinal	Humanos	Fecal-oral
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, úlcera péptica	Humanos, macacos, gatos	Fecal-oral
<i>Helicobacter</i> spp.	Gastroenterite, bacteremia, etc.	Animais domésticos	Fecal-oral, alimentos
<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirose	Cães, gatos, porcos, ratos	Alimentos-água ²
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	Humanos	Sexual
<i>Vibrio</i> spp.	Gastroenterite	Alimentos, água	Alimentos ¹

¹- Ingestão de alimentos e água contaminados

²- Alimentos ou água contaminados com urina de animal infectado

RECURSOS DIAGNÓSTICOS

Agente	Testes *
<i>Arcobacter</i> spp.	<ul style="list-style-type: none">- Microscopia: bacilos Gram negativos curvos ou helicoidais- Cultura: cresce entre 15 a 30°C em ambiente específico de combinação de gases em CAMPY-CVA.- Sorologia: Não disponível
<i>Borrelia burgdorferi</i> (doença de Lyme)	<ul style="list-style-type: none">- Microscopia: espiroquetas coradas por coloração de prata de Warthinneg Starry ou anticorpos marcados por fluoresceína em tecidos- Cultura: meio BSK II em microaerofilia entre 30-37°C por 6 semanas- Sorologia; Imunofluorescência e ELISA
<i>Borrelia</i> spp.	<ul style="list-style-type: none">- Microscopia: espiroquetas coradas pelo Giemsa, Wright de amostras de sangue- Cultura igual de <i>B. burgdorferi</i>
<i>Campylobacter coli</i> e <i>C. jejuni</i>	<ul style="list-style-type: none">- Microscopia: bacilo fino e curvo, Gram negativo, mas mal corado pelo Gram.- Cultura: cresce a 37 e 42°C em ambiente específico de combinação de gases em Campy-CVA
<i>Campylobacter fetus</i>	<ul style="list-style-type: none">- Microscopia: bacilo fino e curvo, Gram negativo, mas mal corado pelo Gram- Cultura: cresce em ágar sangue a 37°C, mas não a 42°C em ambiente específico de combinação de gases

<i>Helicobacter pylori</i>	-	Microscopia: biópsia gástrica corada por H&E, Giemsa ou coloração pela prata de Warthin-Starry.
	-	Recurso rápido; teste da urease em biópsia gástrica (sensibilidade >90%)
	-	Cultura: cresce em meios seletivos ou não em microaerofilia a 37°C por 5-7 dias
	-	Sorologia: útil para determinar doença ativa por Enzima-Imunoensaio
<i>Leptospira spp.</i>	-	Pesquisa no sangue, LCR e urina: microscopia em campo escuro (baixa sensibilidade) ou por imunofluorescência direta
	-	Cultura: primeiros 10 dias de doença - LCR e sangue colhido com heparina em meio de Fletcher incubado à temperatura ambiente por 2 a 16 semanas. Cultura do sedimento urinário alcalinizado após a 1ª semana da doença.
	-	Sorologia: aglutinação ou ELISA são sensíveis e específicos
<i>Treponema pallidum</i>	-	Linfa de lesões observadas em campo escuro ou coloração pela prata (Fontana); presença de espiroquetas. Imunofluorescência direta mais sensível
	-	Sorologia: VDRL ou FTA-abs são muito úteis para diagnóstico

* Recursos não citados: não úteis ou não disponíveis

BSK II = meio de Barbour Stoenner-Kelly

Campy-CVA= Meio seletivo para *Campylobacter* com cefoperazona, vancomicina e anfotericina.

CAMPYLOBACTER

MATERIAL

Em caso de gastroenterite colher fezes e enviar rapidamente ao laboratório ou em meio de transporte de Cary-Blair semi-sólido. Em amostras de sangue colhidas em meios convencionais, estas podem suportar o crescimento do *C. fetus* que é a espécie que causa com maior frequência infecções extra-intestinais.

MICROSCOPIA

A coloração de Gram deve usar no lugar da safranina a carbol-fucsina ou fucsina básica a 0,1% durante 2 minutos. Exame de fezes costuma revelar presença de leucócitos, mas a ausência não contra-indica a cultura ou a suspeita diagnóstica. O Gram das fezes tem sensibilidade entre 70 a 90% e elevada especificidade.

Principais espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter*

Bactéria	Catalase	H ₂ S-TSI	Cresc. 15°C	Cresc. 25°C	Cresc. 42°C	Mac Conkey	Ácido Nalidixico	Cefalotina
<i>C. jejuni</i>	+	neg	neg	neg	+	+	sensível ou resistente	resistente
<i>C. coli</i>	+	neg	neg	neg	+	+	sensível	resistente
<i>C. fetus</i>	+	neg	neg	+	neg	+	sensível ou resistente	sensível
<i>Campylobacter</i> spp.	variável	+	neg	neg	+	variável	sensível ou resistente	sensível *
<i>Arcobacter</i>	+	neg	+	+	variável	variável	sensível	variável

* *C. lari* = resistente

ISOLAMENTO

A maioria das espécies de *Campylobacter* exige microaerofilia contendo cerca de 5% de CO₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (microaerofilia), obtidos com geradores específicos e não apenas com vela. Para aumentar a chance de isolamento em fezes recomenda-se a filtração das fezes em filtro de acetato de celulose >0,45 µm. Vários são os meios de cultura específicos para coprocultura por serem seletivos, sendo na atualidade os mais recomendados o ágar carvão desoxicolato cefoperazona, o meio Campy CVA (Cefoperazona, Vancomicina e Anfotericina) e o meio de Karmali (base de Columbia ágar, carvão ativado e suplemento de antibióticos).

Amostras de hemocultura devem ser repicadas em meios não seletivos com geradores para microaerofilia. Fazer o teste de crescimento a 25, 37 e 42°C (todos crescem a 37°C). No exame direto em gota direta no microscópio entre lâmina e lamínula pode-se observar a motilidade tipo hélice em movimento.

As provas de crescimento devem ser feitas em ágar Mueller Hinton com 5% de sangue de carneiro em microaerofilia. O teste de sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina pode ser feito em qualquer meio não seletivo e será considerado sensível a presença de qualquer tamanho de halo.

VIBRIOS, AEROMONAS E PLESIOMONAS

A suspeita da presença de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* é evidenciada pelo:

- Isolamento de bactéria Gram negativa fermentadora da glicose (TSI fermentador) e oxidase positiva.
- Materiais clínicos que podem, eventualmente, ser associados com maior frequência de isolamentos de *Vibrios*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*.

Principais bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva e sua associação com diferentes quadros clínicos:

Bactéria	Diarréia	Infecções partes moles	Sepse	Outros
<i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	freqüente	pouco comum	raro	raro
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	freqüente	raro	freqüente *	raro
<i>Aeromonas hydrophila</i>	freqüente	frequente	freqüente	freqüente
<i>Aeromaonas caviae</i>	freqüente	raro	freqüente	freqüente
<i>Aeromonas veronii</i>	freqüente	raro	freqüente	freqüente

* associado à meningite em recém-nascidos

VIBRIO

As espécies do Gênero *Vibrio* são bacilos curvos ou às vezes retos, longos, anaeróbios facultativos, móveis, fermentadores da glicose, em geral sem produzir gás, e oxidase positivas. Além do *Vibrio cholerae*, existem mais de 10 espécies patogênicas para o ser humano. Algumas espécies podem causar gastroenterite, outras infecções cutâneas e bacteremias.

A cólera, é causada pelo *V. cholerae* produtor de toxina (dois biotipos: clássica e El Tor), responsável por diarréia secretória disseminada por via fecal-oral (água e alimentos contaminados) em surtos e epidemias associadas à falta de condições sanitárias adequadas. O quadro clínico pode variar de assintomático a diarréia aguda com morte em 5 horas por desidratação e distúrbio eletrolítico. Casos esporádicos podem ocorrer por ingestão de ostras e outros pescados crus ou mal cozidos.

A coleta do material quando for fecal deverá ser feita utilizando o meio de transporte de Cary & Blair, e as cepas suspeitas ou confirmadas de *Vibrio* deverão ser encaminhadas a Laboratório de Referência, para registro epidemiológico.

Algumas outras espécies de *Vibrios* além do *V. cholerae* necessitam de NaCl para crescimento. Ágar sangue e Mac Conkey permitem o crescimento da maioria das espécies, e neste último meio as colônias são semelhantes a de bastonetes não fermentadores. A diferença é que no TSI, EPM ou IAL há fermentação da glicose, como ocorre também com *Aeromonas* e *Plesiomonas*. São oxidase positivas, a maioria é esculina negativa, DNase positivo e quase todos crescem em caldo com NaCl 6%.

AEROMONAS E PLESIOMONAS

Vivem em ambientes aquáticos em todas as partes do mundo. Podem ser encontradas em água de fonte, água de lagos, águas poluídas, etc. *Plesiomonas* preferem águas tropicais e não marinhas, sendo a *Aeromonas* mais tolerante às diferentes condições. *Aeromonas* têm sido isoladas em carnes, meio ambiente aquático e produtos do mar, e suas diferentes espécies causam doenças não só no homem como em animais, peixes, répteis, cobras e pássaros.

Em nossa experiência é comum o isolamento de *Aeromonas* em abscesso pós-picada de cobra, líquido biliar em pacientes com colicistite, diarreia, sepse (em pacientes com doença hepática crônica) e abscessos cutâneos pós-acidentes (corto-contusos) em lagos, tanques, etc. A chance de detectar *Aeromonas* e *Plesiomonas* depende da adoção do procedimento em se fazer o teste da oxidase em bactérias com características de *Escherichia coli* lactose negativa.

As principais características das *Aeromonas* são: lactose negativa, H₂S negativo, fenilalanina negativa, indol positivo, motilidade positiva, e crescem bem em meios ricos e seletivos (Mac Conkey e Salmonella-Shigella).

Principais provas diferenciais entre *Aeromonas* spp., *E.coli* e *Citrobacter* spp.

Bactérias	Citrato	Uréia	Lisina	H ₂ S	Lactose	Gás
<i>E. coli</i>	neg	neg	+	neg	+	+
<i>Citrobacter</i> spp.	+	variável	neg	variável	variável	+
<i>Aeromonas</i> spp.	variável	neg	+	neg	neg ¹	variável

¹- *Aeromonas caviae*: lisina negativa e lactose positiva

Provas diferenciais para bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva: *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*

Provas	<i>V. cholerae</i>	Outros vibrios	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Plesiomonas</i> spp.
Cresce sem NaCl ¹	+	neg ²	+	+
Cresce com 6% NaCl ¹	+	+	neg	neg
Oxidase	+	+	+	+
DNAse	+	+	+	neg

¹- crescimento em caldo nutriente

²- exceto *V. mimicus*

Provas para diferenciar as principais espécies de *Aeromonas* e *Plesiomonas*

Bactérias	Indol	LIS	ARG	ORN	ARA	LAC	SAC	ESC	HEM *
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	neg	+	neg	+	+	+
<i>A. caviae</i>	+	neg	+	neg	+	+	+	+	neg
<i>A. sobria</i>	+	+	+	neg	neg	neg	+	neg	+
<i>A. veronii</i>	+	+	neg	+	neg	neg	+	+	+
<i>A. jandaei</i>	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg	+
<i>A. schubertii</i>	neg	+	+	neg	neg	neg	neg	neg	Variável
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg

LIS = lisina ARG = arginina ORN = ornitina ARA = arabinose LAC = lactose SAC = sacarose
ESC = esculina HEM * = hemólise / sangue carneiro

6. BACIOS GRAM POSITIVOS

INTRODUÇÃO

Este capítulo aborda os aspectos práticos para identificação dos principais bacilos Gram positivos de importância clínica.

Bactérias consideradas:

Corineformes	<i>Arcanobacterium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>G. vaginalis</i> , <i>Oerskovia</i> spp., <i>Rhotia</i> spp.
Bacilos Gram positivos regulares	<i>Erisipelotrix</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Kurthia</i> spp.
Esporulados	<i>Bacillus</i> spp.
Bacilos ramificados (Actinomycetos)	<i>Nocardia</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp.

Bactérias Gram positivas que são citadas no texto para fins de diagnóstico diferencial, mas que foram abordadas em outros capítulos são:

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">▪ <i>Actinomyces</i> spp. (anaeróbios)▪ <i>Clostridium</i> spp. (anaeróbios)▪ <i>Lactobacillus</i> spp. (anaeróbios)▪ <i>Mycobacterium</i> spp. (micobactérias) | <p>Outros anaeróbios:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ <i>Mobiluncus</i> spp.▪ <i>Propionibacterium</i> spp.▪ <i>Eubacterium</i>▪ <i>Bifidobacterium</i> spp. |
|--|---|

Os *Actinomyces* spp. e alguns *Propionibacterium* spp. embora anaeróbios, podem ser aerotolerantes, e crescer em aerobiose.

ORIENTAÇÃO GERAL NA IDENTIFICAÇÃO DE BGPS

Para triagem inicial dos Bacilos/cocobacilos Gram positivos, algumas observações e provas são fundamentais:

- Colher material com antisepsia rigorosa para evitar contaminação.
- Mesmo em líquidos estéreis há risco de contaminação, por isso pede-se a coleta de no mínimo duas hemoculturas. No LCR o resultado do Gram do sedimento e a presença de neutrofilia reforçam a hipótese de ser agente infeccioso.
- Valorizar o achado em pacientes imunocomprometidos.
- Procurar sempre ter bacterioscopia do material clínico onde foi isolado o Bacilo Gram Positivo (BGP) e verificar se há predomínio do agente em questão; é relevante o achado dentro de macrófagos / neutrófilos.
- Valorizar materiais nobres (sangue, LCR, pericárdico, etc.), biópsias, aspirados de abscessos, LBA, etc., desde que a bacterioscopia e o quadro clínico sejam compatíveis.
- Cuidado com contaminação por bactérias da flora de mucosas.
- Em caso de abscessos é interessante fazer semeadura quantitativa (com alça calibrada), sendo sugestivo o isolamento de $>10^4$ UFC/ml.
- Em urina é sugestivo quando isolado como único agente, bacterioscopia concordante, leucocitúria, sintomas de infecção urinária e contagem $>10^5$ UFC/ml.
- Observar características da colônia: cor, tamanho, cheiro, consistência, hemólise, etc.
- Testar em quais meios cresce o BGP e suas condições de incubação.
- Para observar esporos e hifas aéreas algumas vezes é necessário deixar a colônia envelhecer ou crescer em meios pobres.

- É sempre interessante semear em meio sólido e em caldo para observar variação morfológica; observar ramificações em diferentes condições e meios de cultivo.
- Fazer coloração de Ziehl ou de Kinyoum para pesquisa de álcool-ácido resistente.
- Lembrar que este grupo de bactérias pode variar muito nas características morfológicas quando observado no material clínico culturas jovens, culturas velhas, meios sólido ou líquido, meio rico ou pobre, etc., sem que represente contaminação ou cultura mista. No entanto, algumas destas bactérias são habitantes de mucosas e podem causar infecção mista associada ou não com anaeróbios estritos.

CORINEFORMES

São classificados como corineformes as seguintes bactérias:

- *Corynebacterium* spp.
- *Arthrobacter* spp.
- *Brevibacterium* spp.
- *Curtobacterium* spp.
- *Exiguobacterium* spp.
- *Arcanobacterium* spp.
- *Microbacterium* spp.
- *Aureobacterium* spp.
- *Turicella* spp.
- *Dermabacter* spp.
- *Gardnerella* spp.
- *Rothia* spp.
- *Cellulomonas* spp.

Entre os corineformes foram selecionados aqueles de maior importância clínica, sendo recomendável a caracterização e provas diferenciais apenas dos gêneros:

- *Corynebacterium* spp.
- *Arcanobacterium* spp.
- *Gardnerella* spp.
- *Rothia* spp.

PRINCIPAIS DOENÇAS ASSOCIADAS AOS BACILOS GRAM POSITIVOS

Bactéria	Quadro clínico
<i>Actinomyces</i> spp., <i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. odontolyticus</i> e outros	Actinomicose, doença granulomatosa predominante cervico-facial
<i>Arcanobacterium</i> spp., <i>A. nhaemolyticum</i>	faringite, infecção de partes moles, endocardite, etc
<i>Bacillus</i> sp, <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i>	Antraz, intoxicação alimentar, sepse e pneumonia em imunossuprimidos e neutropênicos
<i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i>	difteria
<i>C. jeikeium</i>	endocardite, bacteremia
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Zoonose, linfadenite e abscessos
<i>Erysipelotrix</i> sp	celulite em veterinários e zona rural
<i>Gardnerella</i> spp.	vaginose, endometrite, pós-parto
<i>Lactobacillus</i> spp.	flora oro-intestinal e vaginal, raríssimo patógeno
<i>Listeria</i> spp.	meningite, sepses, aborto
<i>Nocardia</i> spp.	abscesso cerebral, abscesso pulmonar, etc. em imunocomprometidos
<i>Oerskovia</i> spp.	bacteremia, infecção associada a corpo estranho
<i>Rhodococcus</i> spp.	pneumonia, abscessos, etc. em imunocomprometidos
<i>Rothia</i> spp., <i>R. dentocariosa</i>	endocardite, bacteremia, infecções respiratórias
<i>Streptomyces</i> spp.	Oportunista, infecções de partes moles, etc.

Triagem inicial para Bacilos e Cocobacilos Gram positivos

Bactéria	Esporo	Anaer.	AAR *	Ramif.	Hemólise	Catalase	Obs.
<i>Actinomyces</i> spp.	neg	+	neg	neg	neg	V	
<i>Arcanobacterium</i> spp.	neg	neg	neg	raro /curto	beta	neg	Pleomórfico
<i>Bacillus</i> spp.	+	neg	neg	neg	variável	+	
<i>Clostridium</i> spp.	+	+	neg	neg	variável	neg	
<i>Corinebacterium</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	variável	paliçada
<i>Erisipelotrix rhusiopathie</i>	neg	neg	neg	neg	alfa	neg	H ₂ S +
<i>Gardnerella vaginalis</i>	neg	neg	neg	neg	beta /coelho	neg	Gram lábil
<i>Lactobacillus</i> spp.	neg	+	neg	neg	neg	variável	
<i>Mobiluncus</i> spp.	neg	+	neg	neg	neg	neg	móvel
<i>Listeria</i> spp.	neg	neg	neg	neg	beta	+	móvel
<i>Mycobacterium</i> spp.	neg	neg	+	variável	neg	+	cresc. lento
<i>Nocardia</i> spp.	neg	neg	+	+	neg	+	col. laranja
<i>Oerskovia</i> spp.	neg	neg	neg	variável	neg	+	col. amarela
<i>Ppropionibacterium</i> spp.	neg	+	neg	+	neg	variável	
<i>Rhodococcus</i> spp.	neg	neg	variável	variável	neg	+	col. coral
<i>Rhotia dentocariosa</i>	neg	neg	neg	+	neg	+	Pleomórfico
<i>Streptomyces</i> spp.	neg	neg	neg	+	neg	+	raro, hifas

* AAR = alcool-ácido resistente

É importante destacar que os corineformes correspondem a um grupo não homogêneo de bactérias com poucas características em comum sendo também morfológicamente muito distintos:

CORYNEBACTERIUM SPP

O gênero *Corynebacterium* compreende cerca de 50 espécies, sendo cerca de 30 de algum interesse médico.

Estas espécies podem ser diferenciadas por provas como:

- OF glicose
- redução de nitrato
- urease
- utilização de diferentes carboidratos
- reação de CAMP

Principais características:

- não se ramificam
- não são alcool-ácido resistentes
- catalase positivas
- imóveis
- esculina e gelatina negativas

MORFOLOGIA

Variam muito na morfologia das diferentes espécies, e mesmo mesmas culturas em diferentes condições de cultivo. São bacilos Gram positivos, retos ou ligeiramente curvos, com extremidades em geral arredondadas, com a forma de clava, podendo apresentar arranjos característicos em paliçada ou letras chinesas, podendo ou não apresentar grânulos metacromáticos, que são melhores visualizados através da coloração de Albert-Laybourn, e que caracterizam as bactérias conhecidas como difteróides. As corinebactérias de maior importância clínica são catalase positivas, imóveis podendo ser fermentadoras ou não.

São muitas as corinebactérias que se pode isolar em material clínico, entretanto, é de pouco interesse aprofundar na caracterização destas espécies, exceto para fins de pesquisa ou epidemiológicos.

CORINEBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Considera-se fundamental o laboratório de microbiologia poder caracterizar ou afastar a possibilidade de isolamento das espécies de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* que podem produzir a toxina diftérica. Outra espécie de importância em infecções hospitalares e frequentemente isolada em material clínico é a *C. jeikeium*.

Difteria

Em virtude da vacinação compulsória, a difteria na atualidade é uma doença rara em pacientes imunizados, mas de importância epidemiológica quando detectada. A infecção caracteriza-se por processo infeccioso localizado no trato respiratório e manifestações tóxicas no coração e nervos periféricos.

Quadro clínico	Coleta de material	Processamento do material	Bacterioscopia
<p>Ocorre dor de garganta, dificuldade de deglutição, presença de pseudomembrana purulenta, dor no corpo, cefaléia, náuseas e febre.</p> <p>A morte pode ocorrer por obstrução respiratória ou por miocardite. Pode ocorrer difteria cutânea com lesões necróticas e, eventualmente, presença de pseudomembrana.</p>	<p>O material de orofaringe ou nasofaringe deve ser colhido das bordas, abaixo da pseudomembrana purulenta.</p>	<p>Semear em meios não específicos como ágar sangue e ágar chocolate para pesquisa do <i>Streptococcus pyogenes</i> e outros patógenos eventuais, e encaminhar outro swab em meio de transporte para o laboratório de referência.</p> <p>Os meios específicos para a pesquisa de bacilo diftérico são os meios de enriquecimento de Loeffler e o meio seletivo e diferencial ágar sangue-cistina-telurito.</p>	<p>A bacterioscopia do esfregado do material, bem como do crescimento no meio de Loeffler, após coloração de Gram pode ser sugestiva caso sejam visualizados bacilos difteróides, melhor caracterizados pela coloração de Albert-Laybourn.</p> <p>A identificação bioquímica das Corynebactérias potencialmente produtoras de toxina é difícil em laboratório não especializado. Recomenda-se, nestes casos, encaminhar o material ou contactar o Laboratório de Referência para orientação.</p>

PROVAS DIFERENCIAIS PARA OS CORINEFORMES

Bactéria	Catalase	O/F ¹	Motilidade	Uréia	Esculina	CAMP Reverso	Hemólise
<i>Arcanobacterium</i> spp.	neg	F	neg	neg	neg	+	beta
<i>C. diphtheriae</i>	+	F	neg	neg	neg	neg	neg
<i>C. jeikeium</i>	+	O	neg	neg	neg	neg	neg
<i>C. ulcerans</i> <i>/Pseudotuberculosis</i>	+	F	neg	+	neg	+	neg
<i>Corinebacterium</i> spp.	+	F	variável	variável	neg	neg	neg
<i>Gardnerella vaginalis</i>	neg	F	neg	neg	neg	neg	beta ²
<i>Oerskovia</i> spp.	+	F	variável	neg	+	neg	neg
<i>Rhotia</i> spp.	variável	F	neg	neg	+	neg	neg

¹ Base CTA (cystine tripticasase ágar) O = oxidativo e F = fermentador

² ágar sangue de coelho

C. PSEUDOTUBERCULOSIS

Importância clínica	Deve ser lembrado nos casos de veterinários ou trabalhadores de zona rural com quadro de linfadenite, linfangite ulcerativa ou abscesso relacionado a manuseio de aborto de gado. Esta espécie pode ser produtora de toxina diftérica.
Isolamento e Identificação	As colônias são pequenas, branco-amareladas, urease positiva, CAMP reverso positivo (inibe a beta-hemólise do <i>S. aureus</i> em ágar sangue com hemácias de carneiro).

C. JEIKEIUM

Características gerais	Colônia pequena cinza ou translúcida, a bacterioscopia é um pequeno coco-bacilo gram positivo, resistente a vários antibióticos (beta-lactâmicos, gentamicina, etc).
Importância clínica	Associada a septicemia, endocardite, infecções de pele e tecido subcutâneo. Infecções mais severas podem ocorrer em imunossuprimidos, como meningite, pneumonia e peritonite ou associada a próteses e procedimentos invasivos.
Isolamento e Identificação	Cresce em BHI com 1% de Tween 80, sendo lipofílica e não em caldo BHI sem Tween 80. Apresenta metabolismo oxidativo na base CTA, enquanto a maioria das <i>Corynebacterium</i> spp. de importância clínica são fermentadoras. Oxida a glicose, é uréia negativa, esculina negativa, PYR positiva.

ROTHIA * DENTICARIOSA

Características gerais	São bacilos Gram positivo retos, sendo alguns ramificados.
Importância clínica	Pertence à microbiota da cavidade oral, e está raramente associada à endocardite.
Isolamento e Identificação	As colônias são brancas salientes e às vezes rugosas. São fermentadores da glicose e esculina positiva.

* *Rhotia* spp.: São pleomórficos podendo apresentar-se tanto na forma cocóide como de bacilos. São catalase positiva, imóvel e fermentador.

ARCANOBACTERIUM SPP.

Características gerais	São bacilos delicados e curvos e alguns apresentam dilatação terminal e ramificações rudimentares.
Importância clínica	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> tem sido considerado juntamente com <i>S. pyogenes</i> como agentes patogênicos em orofaringe, identificados e relatados com a finalidade de tratamento. Está associado com infecções de partes moles, faringite em jovens e raros casos de septicemia, endocardite e osteomielite.
Isolamento e Identificação	Crescem em 24-48h como colônias pequenas e hemolíticas. Colônias mais velhas tendem a adquirir a forma de coco-bacilo, que pode ser confundido com estreptococos. Em caldo tendem a formar ramificações e em anaerobiose filamentos. São bacilos Gram positivos irregulares, catalase negativa, imóveis e fermentadores. Espécies <i>A. haemolyticum</i> , <i>A. pyogenes</i> e <i>A. bernardiae</i> são hemolíticas, têm a hemólise melhor visualizada em sangue de coelho, e crescem melhores em CO ₂ . Pode se apresentar como dois tipos de colônias no mesmo cultivo: lisas, mucóides e brancas ou secas e cinza. Produz a prova de CAMP reverso (inibição da hemólise).

GARDNERELLA SPP.

Características gerais	São pequenos bacilos ou coco-bacilos irregulares, que se coram irregularmente pela violeta. A principal espécie é a <i>Gardnerella vaginalis</i> , que tem uma classificação taxonômica incerta, e portanto para fins didáticos, estudada com os coryneformes.
Importância clínica	Faz parte da microbiota vaginal de cerca de 70% das mulheres em idade reprodutiva, mas está associada à vaginose bacteriana, quando predomina na flora vaginal em substituição ao <i>Lactobacillus</i> de Doderlein. A vaginose bacteriana e a presença de <i>Gardnerella</i> estão associadas também ao parto prematuro, ruptura prematura de membranas e corioamnionite. Esta bactéria é comumente isolada em hemoculturas de pacientes com febre puerperal e pós-aborto. Pode causar sepse em recém-nascidos e raramente infecção urinária em adultos.
Isolamento e Identificação	Crescem no ágar sangue humano e de coelho produzindo hemólise beta, mas sem hemólise no ágar sangue de carneiro. São visualizadas e caracterizadas no exame citológico e/ou no Gram pela presença das "clue cells", que são células epiteliais abarrotadas de pequenos bacilos Gram lábeis, de modo a perder sua definição morfológica. É pleomórfica, Gram variável (ora Gram negativa ora parcialmente e fracamente Gram positiva), imóvel, sem cápsula. É um anaeróbio facultativo, fermentador lento, catalase e oxidase negativas.

OERSKOVIA SPP.

Características gerais	São microrganismos cocóides ou na forma de bacilos resultantes da quebra de micélios, apresentam ramificação, hifas vegetativas, sem hifas aéreas e penetração no ágar. <i>Oerskovia turbata</i> e <i>O. xanthineolytica</i> são bactérias do meio ambiente ou solo, com pouca importância clínica, com raros casos de bacteremia e infecções em implantes de próteses.
Isolamento e Identificação	Cresce bem em ágar sangue de carneiro e no ágar chocolate. Cresce mal no meio de Sabouraud dextrose. O crescimento, quando ocorre, é visível após 24-48h em anaerobiose ou 5% CO ² . Apresentam colônias amareladas, catalase positiva em aerobiose, oxidase negativa. Fermentador da glicose, sacarose e lactose, hidrolisa gelatina, amido e esculina; motilidade variável.

BACILOS GRAM POSITIVO

LISTERIA

Características gerais	São bacilos uniformes, não ramificados, apresentando-se só ou em pequenas cadeias. A única espécie importante para o homem entre as sete espécies conhecidas é a <i>L. monocytogenes</i> . Móvel a temperatura ambiente (25 a 28°C) e imóvel a 37°C. Encontrada na natureza no solo, em matéria orgânica em decomposição, água, leite e derivados, carne, etc. Sendo encontrada como microbiota de diversos mamíferos, aves, peixes, e insetos.
Importância clínica	Tem importância clínica particularmente para idosos e imunocomprometidos causando meningite, encefalite ou septicemia. Na grávida a infecção pode causar amnionite, infecção do feto com aborto, parto prematuro, meningite neonatal e sepse neonatal. Pode ocorrer em surtos, em geral relacionados a contaminação de alimentos.
Isolamento e Identificação	Crescem em ágar sangue, ágar Chocolate, CLED, ágar nutriente, TSA e ágar Mueller Hinton, mas não em Mac Conkey. As colônias são pequenas, crescendo melhor entre 30 a 37°C, e crescem também à temperatura ambiente e a 4°C em três a quatro dias. A partir de hemoculturas, LCR, placenta, alimentos, água, etc., semear em ágar sangue de carneiro, coelho ou cavalo, com base TSA, embora cresça também com outras bases (Mueller Hinton, Columbia, Brucella, BHIA, etc). Existem meios seletivos indicados em investigações epidemiológicas. Bacilo Gram positivo anaeróbio facultativo, catalase positiva, oxidase negativa, que produz ácido de glicose. Hemólise beta em ágar sangue de carneiro, CAMP positivo, motilidade positiva à temperatura ambiente, hidrólise da esculina positiva e NaCl 6,5% positiva. É Além disso, é verificada prova da esculina rapidamente positiva, assim como uréia, gelatina, indol e H ₂ S negativas.

ERYSIPELOTRIX RHUSIOPATHIAE

Características gerais	Bacilo Gram positivo curto, de extremidades arredondadas, anaeróbio facultativo, não esporulado, não álcool-ácido resistente, ocorre só em cadeias curtas ou longas, sem ramificar. Existe na natureza, em matéria orgânica, urina, fezes e carcaça de animais. Vive em animais, peixes e pássaros e causa erisipela em porcos. No homem causa uma zoonose (doença ocupacional de veterinários e manuseadores de carne e animais) caracterizada por celulite que aparece no local da inoculação após 2 a 7 dias.
Importância clínica	A lesão costuma ser violácea e com muita dor, acompanhada de edema endureado, sem supuração e bem delineado nas bordas. Ocorre linfangite regional e artrite adjacente. Disseminação da doença e endocardite podem ocorrer, particularmente em imunossuprimidos, cujo prognóstico é grave. Cicatrização pode ocorrer em 2 a 4 semanas ou meses, com possibilidade de recaída.
Coleta do material	Material ideal para isolamento é a biópsia colhida de maneira asséptica. Swab da lesão em geral é negativa, pois o agente encontra-se na profundidade da borda endurecida.
Isolamento e Identificação	<p>Cresce em ágar sangue, ágar chocolate, caldo tripticase soja, a 35°C aerobiose ou 5% de CO₂. Cresce entre 5 a 42°C e em caldo NaCl 6,5%. No ágar sangue cresce em 24 a 72h, como colônias minúsculas, lisas e transparentes, mas o outro tipo de colônia, maior, rugosa e chata pode aparecer, bem como uma hemólise esverdeada em baixo da colônia no ágar sangue. As colônias lisas são bacilos ou coco-bacilos Gram positivos, às vezes corando-se mal pelo Gram</p> <p>Catalase negativa, imóvel, esculina negativa, fermenta lentamente a glicose sem produzir gás, uréia e indol negativos, mas caracteriza-se por crescer no TSI produzindo H₂S; é lactose positiva e sacarose negativa.</p>

KURTHIA

Características gerais	São bacilos Gram positivos grandes em cadeias ou em paralelo, ou filamentos não ramificados e em culturas velhas tendem a ficar cocóides ou bacilos curtos. Vivem no meio ambiente, na água, solo, animais, sua carne e seus derivados.
Importância clínica	Seu papel clínico é questionado, pois não há relatos recentes de isolamento em casos significativos.
Isolamento e Identificação	<p>Crescem em ágar sangue como colônias de cor creme não hemolíticas, podendo ser confundidas com <i>Bacillus</i> spp.</p> <p>São aeróbios estritos, não esporulados, não álcool-ácido resistentes; são móveis, catalase positiva e não fermentadores.</p>

Principais diferenças entre bacilos e coco-bacilos Gram positivos

Bactéria	Gram	Catalase	Motil. 25°C	Hemólise	CAMP test	NaCl 6,5% Esculina
<i>Listeria monocytogenes</i>	bacilo curto ou coco-bacilo regular e largo	+	+	beta	+	+ / +
<i>Enterococcus</i> spp.	cocos ou coco-bacilos em cadeias	neg	neg	Alfa, beta gama	neg	+ / +
<i>Streptococcus</i> beta hemolíticos	cocos em cadeias	neg	neg	beta	neg ¹	neg / neg
<i>Lactobacillus</i> spp.	coco-bacilos e cadeias longas	neg	neg	não	neg	neg / neg
<i>Kurthia</i> spp. ²	bacilo grande, cadeias, cocóide em cultura velha	+	+	não	neg	neg / neg
<i>Corynebacterium</i> spp.	bacilos e coco-bacilos pleomórficos	+	neg	variável	neg	variável / neg
<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i> ³	coco-bacilo ou filamentos longos	neg	neg	alfa	neg	neg / neg

¹- Só *S. agalactiae* (beta do grupo B) é positiva

²- Não usa glicose

³- H₂S positivo

Bacilos Gram positivos anaeróbios que devem ser diferenciados:

- ***Lactobacillus spp.*** - flora da boca, intestino e flora vaginal (Bacilo de Doderlein). São anaeróbios estritos mas crescem em ágar sangue e ágar chocolate como colônias muito pequenas. São imóveis e catalase negativa. Sem valor patogênico.
- ***Mobiluncus*** - bacilos Gram positivos anaeróbios estritos, curvos, móveis que vivem na trato genital humano e reto. Encontra-se aumentado nos casos de vaginose, juntamente com a *Gardnerella*.
- ***Propionibacterium spp.*, *Eubacterium spp.* e *Bifidobacterium spp.*** - anaeróbios estritos que são analisados juntamente com os demais anaeróbios.

BACILOS ESPORULADOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS FACULTATIVOS

Gênero *Bacillus* compreende cerca de 50 espécies de bacilos anaeróbios facultativos que podem exibir a forma esporulada, corando-se mal pela violeta, quando em colônia mais velhas. As formas vegetativas são retas largas, podendo ser grandes, isolados ou em cadeias. A forma e localização dos endosporos são úteis para sua classificação:

- podem ser cilíndricos, ovais, redondos, e eventualmente com forma de feijão
- posição central, sub-terminal, terminal
- dilatando ou não a célula mãe

Todos são móveis, exceto o *B. anthracis* e *B. mycoides* e a maioria é catalase positiva. Na presença de íon bicarbonato (HCO_3^-) e em anaerobiose ou CO_2 os *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. megaterium* apresentam cápsula polipeptídica.

Habitat e importância clínica - Os *Bacillus* spp. encontram-se basicamente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal nas condições mais variadas de temperatura, umidade, pH, etc. As duas espécies mais importantes e que devem ser reconhecidas pelo laboratório de microbiologia são o *B. anthracis* e *B. cereus*.

Principais espécies de *Bacillus* relacionadas à infecção

Espécie de <i>Bacillus</i>	Quadro clínico	Frequência de relatos
<i>Anthraxis</i>	<ul style="list-style-type: none">- Anthrax cutâneo- Anthrax intestinal- Anthrax pulmonar	<ul style="list-style-type: none">- Bastante frequente- Raro- Raro
<i>Cereus</i>	<ul style="list-style-type: none">- Necrose ou gangrena em partes moles- Bacteremia e sepse- Intoxicação alimentar- Infecções pulmonares, endocardite, meningite, osteomielite e endoftalmite	<ul style="list-style-type: none">- Bastante frequente- Frequente- Muito frequente- Frequente
<i>Circulans</i>	<ul style="list-style-type: none">- Infecções de partes moles, abscessos, bacteremia e sepse	<ul style="list-style-type: none">- Frequente
<i>Licheniformis</i>	<ul style="list-style-type: none">- Bacteremia e sepse- Intoxicação alimentar	<ul style="list-style-type: none">- Pouco frequente- Frequente
<i>Subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none">- Intoxicação alimentar- Bacteremia, sepse, endocardite e infecções respiratórias	<ul style="list-style-type: none">- Muito frequente- Raro

Bacillus cereus

Pode apresentar dois tipos de intoxicação:

- Caracterizado por diarreia, dor abdominal, que aparecem 8 a 16 h após a ingestão do alimento contaminado (carnes, vegetais, leite, molhos, massas, doces, bolos).
- Caracterizado por náuseas e vômitos que aparecem 1 a 5 horas após a ingestão do alimento contaminado, principalmente arroz, mas pode ser os mesmos alimentos acima.

Bacillus anthracis

Características gerais	No passado era causa importante de mortalidade no gado, sendo os herbívoros altamente suscetíveis, sendo reduzida pela vacinação e melhores condições de higiene. O homem pode adquirir a doença em contato com animais doentes (trabalhadores área rural e veterinários), no manuseio industrial de ossos, lã, crina, e outros produtos animais e de forma eventual, sendo a forma cutânea quase a totalidade dos casos, com raros episódios intestinais pela ingestão de carne contaminada. Potencial risco elevado na comunidade quando usado como arma biológica.
Quadro clínico	A forma cutânea não tratada pode ser fatal (menos de 20% dos casos), principalmente quando a lesão é próxima a cabeça ou pescoço. As formas pulmonares e intestinais são mais graves pela dificuldade de diagnóstico. No local de inoculação da forma cutânea aparece após 2 a 3 dias uma pequena mancha ou pápula, seguida no dia seguinte de um anel de vesículas em torno da pápula, que ulcera, seca, escurece formando uma escara característica que cresce, fica mais espessa e aderente aos planos profundos. O edema pode ser importante, mas tem a característica de ser indolor e sem pus. A forma intestinal é semelhante à forma cutânea atingindo a mucosa com lesões e eventualmente gastroenterite. No antraz pulmonar o esporo inalado é transportado pelos macrófagos do pulmão para o sistema linfático onde os esporos germinam e causam septicemia que é fatal. Atenção ao fato de que evolução nos casos fatais é inicialmente caracterizada por sintomas leves como fadiga, mal-estar e febre baixa, ou às vezes até sem sintomas, quando repentinamente se instala dispnéia, cianose, febre elevada, desorientação, falência circulatória, choque, coma e morte em poucas horas. Em geral a bacteremia é importante.
Coleta de material	Swab do exudato de lesões podem ser úteis; na escara, remover a crosta e colher material com swab ou com tubo capilar, usando luvas. Na forma intestinal, fezes podem ser colhidas. Pós-morte, sangue venoso ou de sangramento de mucosas (sangue não coagula) pode evidenciar o bacilo na bacterioscopia. No antraz pulmonar a hemocultura é útil nos casos graves, mas o material pulmonar oferece menor chance de isolamento.
Isolamento e Identificação	Em casos clínicos os <i>Bacillus</i> estão na forma vegetativa, mas em alimentos, produtos secos de animais (ossos, crina, pelo) o <i>Bacillus</i> deverá estar em forma esporulada e haverá necessidade de ativá-los a 62,5°C por 15 minutos (choque térmico). Os <i>Bacillus</i> crescem com facilidade em meios pobres ou ricos. Dependendo do material (ex: fezes) poderá haver necessidade de usar meio seletivo com adição de polimixina (100.000U/L). Colônias grandes de cor creme crescem no ágar sangue.

Diferenças entre *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp.

Bacillus spp.

- Endosporos em aerobiose
- Catalase positivos

Clostridium spp.

- Endosporos em anaerobiose
- Catalase negativos

Diferenças entre *B. cereus*, *B. anthracis* e espécies relacionadas

Espécies	Colônia no AS *	Motilidade	Hemólise	Penicilina	Citrato	Lecitinase
<i>B. cereus</i>	esverdeado claro	+	+	resistente	+	+
<i>B. anthracis</i>	branco acinzentado	neg	neg	sem	variável	fraco +
<i>B. thurigiensis</i>	esverdeado claro	+	+	resistente	variável	+
<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycoides</i>	rizóides / espalhando	neg	fraco +	resistente	+	+

* ágar sangue de carneiro

O *B. anthracis* virulento pode ser testado para produção de cápsula semeando-se em ágar nutriente com 0,7% de bicarbonato de sódio em jarra com vela. O crescimento será mucóide e a cápsula poderá ser evidenciada com a tinta da china.

ACTINOMICETOS

Grupo de bactérias Gram positivo que apresentam como características em comum a produção de filamentos ou hifas vegetativas, sendo que alguns também apresentam hifas aéreas, semelhanças de composição de parede e padrão de ácidos graxos celulares.

Neste grupo serão abordados os seguintes gêneros:

- *Nocardia* spp.
- *Rhodococcus* spp.
- *Streptomyces* spp.

O gênero *Oerskovia*, embora apresente hifas vegetativas, é analisado juntamente com os corineformes. Outros actinomicetos raros ou de menor importância clínica não considerados são: *Gordona* spp., *Tsukamurella* spp., *Actinomadura* spp., *Nocardiopsis* spp.

Informações importantes sobre Actinomicetos

Para a adequada caracterização dos Actinomicetos, que apresentam alguma semelhança morfológica com os fungos, é importante considerar:

- A origem do material, valorizando os abscessos.
- A quantidade de microrganismos isolados e correlação com a bacterioscopia do material.
- Possibilidade de contaminação com bactérias da mucosa oral.
- Pigmento da colônia.
- Análise morfológica da bactéria pelo microcultivo em lâmina idêntico ao utilizado na secção de Micologia, empregando ágar fubá sem dextrose a 25°C.

Identificação presuntiva de actinomicetos

Gênero	Micélio aéreo	Conídio	Metabolismo glicose
<i>Nocardia</i>	+		oxidativo
<i>Rhodococcus</i>	neg	neg	oxidativo
<i>Oerskovia</i>	neg	neg	fermentativo
<i>Rhotia</i>	neg	neg	fermentativo

NOCARDIA SPP.

Características gerais	São bacilos Gram positivo ramificados e filamentosos, aeróbios estritos, catalase positivo, imóveis, que se fragmenta em bacilos e cocos irregulares. Produz hifas aéreas à medida que o cultivo envelhece. Existem 12 espécies sendo as mais importantes <i>N. asteroides</i> e <i>N. brasiliensis</i> .
Importância clínica	Está associada ao solo e vegetais. As formas clínicas podem ser bem distintas: pulmonar (abscessos), extra-pulmonar localizada, sistêmica, sistema nervoso central (abscessos), partes moles e micetoma. É considerada uma bactéria oportunista, pois a maioria dos casos não cutâneos e micetomas ocorrem em pacientes imunocomprometidos.
Coleta de material	Quando colhido o material por punção, biópsia ou mesmo swab da lesão profunda, deve ser processado rapidamente; existe uma característica do material descrita como grânulos de enxofre, especialmente nos micetomas.

Isolamento e Identificação	<p>Não é bactéria exigente, crescendo em ágar sangue, ágar chocolate, ágar Sabouraud dextrose, ágar seletivo para <i>Legionella</i> e Lowenstein Jensen. Cresce entre 72h a 14 dias. Com exceção da <i>N. asteroides</i>, a maioria das nocardias apresentam beta-hemólise em ágar sangue de carneiro. Crescem em meio de parafina (como fonte única de carbono), juntamente com <i>Rhodococcus</i> e algumas micobactérias.</p> <p>Em microcultivo é possível visualizar as hifas ramificando-se em ângulo reto, podendo apresentar ramificações secundárias, bem como hifas aéreas. Em cultura mais velhas em ágar tornam-se visíveis as hifas aéreas nas colônias rugosas. As micobactérias de crescimento rápido podem apresentar ramificações bem curtas em ângulo agudo e sem ramificações secundárias.</p> <p>Uma característica importante é a cor das colônias em Sabouraud dextrose ágar ou mesmo em outros meios:</p> <ul style="list-style-type: none"> - salmão ou laranja claro – <i>N. asteroides</i> - laranja escuro – <i>N. brasiliensis</i> <p>A <i>Nocardia brasiliensis</i> é uréia positivo, citrato positivo e gelatina positiva. A <i>Nocardia asteroides</i> é uréia positivo, citrato variável e gelatina negativa.</p>
Bacterioscopia e Histologia	<p>A bacterioscopia pode revelar bacilos irregulares com ramificações e parcialmente ou fracamente álcool-ácido resistentes pelo Ziehl ou coloração de Kinyoun. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina caracterizam os grânulos, mas não os filamentos da bactéria. O Gram ou a coloração de metenamina prata de Gomori são úteis.</p>

RHODOCOCCUS SPP.

Características gerais	<p>O <i>R. equi</i> é uma bactéria oportunista, causando pneumonia em imunocomprometidos, apresentando uma evolução lenta e granulomatosa, com infiltrados que evoluem para cavitação. Pode causar também abscessos no sistema nervoso central, tecido subcutâneo, linfadenite, etc.</p> <p>Diagnóstico clínico diferencial deve ser feito com micobactérias, fungos, nocardia e actinomyces. Hemoculturas com elevada frequência podem ser positivas.</p>
Coleta de Material	<p>Lavado bronco-alveolar (LBA), biópsias, hemocultura e mesmo escarro. Em material clínico o <i>Rhodococcus</i> pode ser visualizado no interior de macrófagos e extra-celular, na forma de cocos ou coco-bacilos. Em hemoculturas, LBA e escarro eventualmente pode ser observado na forma filamentosa.</p>
Isolamento e Identificação	<p>Em microcultivo o <i>R. equi</i> cresce de forma típica como coco-bacilo ou bacilo em zig-zag. Em Heart Infusion ágar (HIA) cresce em 6 horas a 35°C como bacilo Gram positivo e em 24 horas apresenta-se cocóide. A forma de ramificações rudimentares a partir dos filamentos pode ocorrer em culturas jovens em meio líquido.</p> <p>Em HIA cresce entre 28 e 35°C, entre 2 a 4 dias, mas não a 45°C. Pode crescer na forma de colônias rugosas (com hifas aéreas) ou lisas ou mucóides. Pode apresentar a cor coral ou rosa pálido que são mais freqüentes, mas pode ser amarela ou incolor.</p> <p>A coloração pelo Ziehl ou Kinyoun pode revelar a fraca álcool-ácido resistência.</p>

STREPTOMYCES SPP.

Características gerais	<p>Alguns milhares de espécies de <i>Streptomyces</i> já foram caracterizados, sendo na quase totalidade saprófitas. O <i>Streptomyces somaliensis</i> é responsável pelo micetoma de cabeça e pescoço. Outras espécies foram identificadas em casos de pericardite crônica e infecções de partes moles pós-traumáticas (<i>S. griseus</i>).</p>
Isolamento e Identificação	<p>O abscesso pode revelar a presença de grânulos duros. O Gram vai revelar uma massa de bacilos Gram positivo finos.</p> <p>Não é fastidioso, cresce em Sabouraud dextrose melhor incubado a temperatura ambiente entre 4 a 10 dias. Pode-se visualizar no microcultivo hifas finas e longas com ramificações, hifas aéreas e conídios (via assexuada de propagação com forma arredondada).</p> <p>Não é álcool-ácido resistente, e apenas os conídios podem apresentar esta propriedade; metaboliza a glicose por oxidação e cresce a 50°C. As colônias são mais secas com, diferentes pigmentos (creme, marron, preto, etc) e presença ou não de hifas aéreas. Uma característica importante das colônias é o cheiro de terra molhada.</p>

7. FASTIDIOSOS

INTRODUÇÃO

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FASTIDIOSOS

Este grupo heterogêneo de bactérias apresenta como característica comum exigências especiais de condições de cultivo, em relação as enterobactérias e a maioria dos não fermentadores. Estas condições variam para cada microrganismo, podendo ser a necessidade de CO₂, crescimento lento com a necessidade de até 30 dias de incubação (*Brucella*), adição de fatores especiais de crescimento, etc.

Pontos-chave para classificação

- São bactérias Gram negativas ou Gram lábeis (coram-se de forma tênue pela safranina).
- Muitos, mas não todos são coco-bacilos e oxidase positivos; não crescem em Mac Conkey.
- Para teste de fermentação de carboidratos exigem uma base mais rica como o CTA (vide capítulo meios de cultura). O inóculo deve ser bem denso e muitas vezes é necessário a adição de 2 ou 3 gotas de soro de coelho ou cavalo para permitir o crescimento nos meios utilizados para provas bioquímicos.
- Exceto as *Capnocytophaga* spp. que crescem formando colônias grandes e com aparência de véu em torno da colônia, os demais fastidiosos crescem lentamente e exigem 48 a 72 horas para as colônias ficarem bem visíveis, embora diminutas.
- Alguns destes potenciais patógenos estão associados a síndromes clínicas bem definidas, embora não frequentes como a brucelose, tularemia, etc. É importante nestes casos obter informações adicionais com o médico assistente ou o paciente/familiares para facilitar o processo de identificação microbiológica.
- Sempre valorizar isolados de hemocultura, principalmente se ocorrer em mais de uma amostra, ou materiais de bom valor preditivo de infecção como o LCR, líquido pleural, pericárdico, sinovial, BAL, etc.
- Cabe destacar que alguns fastidiosos podem positivar sistemas automatizados de hemoculturas e a bacterioscopia pode ser aparentemente negativa tanto pelo pequeno tamanho da bactéria como pela má coloração pela safranina.
- A topografia da fonte de isolamento é uma pista importante, pois diferentes espécies de *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Capnocytophaga*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Kingella*, *Cardiobacterium* podem ser encontrados em pele e mucosas, a *Gardnerella* e *Cardiobacterium* no trato genital, etc.
- Como a alguns exigem tratamento com drogas não habituais, é extremamente importante chegar a definição de gênero ou encaminhar a Laboratório de Referência. Outro motivo relevante para a correta identificação é a importância epidemiológica que o agente possa ter em surtos ou mesmo em casos isolados, como é o caso da brucelose, legionelose e *Bordetella pertussis*.
- A *Pasteurella* spp. embora incluída neste grupo, cresce com facilidade em Ágar Sangue, Ágar Chocolate, comportando-se no TSI como fermentador, mas não cresce em Mac Conkey . É oxidase positiva.
- Alguns dos fastidiosos estão relacionados a contato com saliva, sangue, fezes, através de acidente perfuro-cortante ou mordida de animais domésticos ou silvestres (*Pasteurella*, *Bartonella*, *Francisella* e *Brucella*).
- Destaca-se ainda a necessidade de precauções especiais no manuseio de alguns destes agentes pelo potencial patogênico (*Brucella* e *Francisella*).

Com base na importância clínica e epidemiológica, este grupo de bactérias será dividido em dois grupos:

Grupo A: maior interesse clínico e epidemiológico

Grupo B: casos clínicos esporádicos / microbiota oral humana

GRUPO A - MAIOR INTERESSE CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

Bactéria	Hospedeiro principal	Via de transmissão
<i>Bordetella pertussis</i> <i>/parapertussis</i>	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Bartonella</i> spp.	Gatos, humanos infectados, outros desconhecidos	Mordida ou arranhão de gato; picada de piolho infectado
<i>Brucella</i> spp.	Mamíferos domésticos	Leite e derivados, carne, sangue, secreções de animais doentes
<i>Francisella</i> spp.	Animais silvestres	Picada de carrapato ou mosquito infectado em zona endêmica
<i>Haemophilus</i> spp.	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Legionella</i> spp.	Meio ambiente/água	Inalação de água contaminada
<i>Pasteurella</i> spp.	Animais domésticos/silvestres	Mordida e secreções de animais domésticos e silvestres

GRUPO B - CASOS CLÍNICOS ESPORÁDICOS

Bactéria	Fonte
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Cavidade Oral humana
<i>Cardiobacterium hominis</i>	Cavidade oral humana
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Cavidade oral humana
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Água e solo
<i>Eikenella corrodens</i>	Cavidade oral humana
<i>Kingella</i> spp.	Cavidade oral humana
<i>Streptobacillus</i> spp.	Boca de roedores

As características deste grupo heterogeneo são:

- Dificuldade ou ausência de crescimento em meios ricos como Ágar Sangue e Ágar Chocolate.
- Exigência de incubação em diferentes tensões de CO₂.
- Dificuldade em caracterizá-los, pois exigem meios enriquecidos.
- Crescimento lento e pouca importância clínica, talvez pela dificuldade do seu isolamento e caracterização.
- Os gêneros *Actinobacillus*, *Capnocytophaga* e *Eikenella* tem em comum o fato de pertencerem à microbiota da cavidade oral humana e estarem relacionados à doenças gengivais e, a partir deste foco, doenças sistêmicas.
- *Kingella* e *Cardiobacterium* estão associadas ao trato respiratório humano.
- Diferem deste grupo a *Chromobacterium* que é encontrada na natureza em água e solo e *Streptobacillus* na orofaringe e nasofaringe de camundongos selvagens e de laboratório.

PRINCIPAIS FASTIDIOSOS E DIAGNÓSTICO

Bactéria	Material clínico	Meio específico	Incubação
<i>Bordetella pertussis</i>	Swab nasofaringe	Meio de Bordet & Gengou	7 dias
<i>Bartonella spp.</i>	Sangue, gânglios, biópsias	Ágar chocolate, Ágar sangue carneiro	5 a 15 dias
<i>Brucella spp.</i>	Sangue, aspirado de medula	Rotina de hemocultura ou meio de Castañeda	Até 30 dias
<i>Francisella spp.</i>	Gânglios, biópsias	Ágar chocolate enriquecido	7 dias
<i>Haemophilus spp.</i>	Sangue, LCR, etc.	Ágar chocolate de cavalo	48-72 h até 7 dias
<i>Legionella spp.</i>	Secreções ou aspirados de trato respiratório inferior	Meio específico BCYE *	7 a 14 dias
<i>Pasteurella spp.</i>	Sangue, LCR, lesões	Ágar sangue, Ágar chocolate	24 a 72 h

* ágar extrato de levedura, carvão, com pirofosfato férrico e alfa-cetoglutarato.

PRINCIPAIS PROVAS DIFERENCIAIS ENTRE OS FASTIDIOSOS

Bactérias	Oxidase	Catalase	Motilidade	Ágar Sangue	Ágar Chocolate
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	neg /+ fraco	+	neg	+	+
<i>Bartonella spp.</i>	neg	neg	variável	+	+
<i>Bordetella pertussis</i>	+	variável	neg	neg	neg
<i>Brucella spp.</i>	+	+	neg	+	+
<i>Capnocytophaga spp.</i>	neg	neg	neg	+	+
<i>Cardiobacterium hominis</i>	+	neg	neg	+	+
<i>Chromobacterium spp.</i>	V	+	+	+	+
<i>Eikenella corrodens</i>	+	neg	neg	+	+
<i>Francisella tularensis</i>	neg	+ fraco	neg	neg	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+ fraco	+	neg	neg	+
<i>Kingella spp.</i>	+	neg	neg	+	+
<i>Legionella spp.</i>	+ fraco	+ fraco	+ fraco	neg	neg
<i>Pasteurella spp.</i>	+	+	neg	+	+
<i>Streptobacillus spp.</i>	neg	neg	neg		

BARTONELLA

A classificação taxonômica dos membros do gênero *Bartonella* ainda não é definitiva e agrupa as espécies *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. hensleae*, *B. elizabethae* e *Afipia felis*.

B. bacilliformis - é o agente etiológico da verruga peruana (febre de Oroya), doença restrita aos Andes, caracterizada por profunda anemia, trombocitopenia, adenopatia, mialgia, delírio, coma e alta mortalidade.

B. quintana - é causa de doença febril que atacou soldados na I Guerra Mundial, conhecida como febre das trincheiras e relacionado a picada de piolhos e baixa higiene. Caracterizada por febre e bacteremia com duração variável e ainda não bem conhecida. Casos associados à infecção por HIV foram relatados.

B. henselae - pode apresentar quadro de bacteremia principalmente em imunossuprimidos bem como relacionada à doença da arranhadura do gato. O quadro de bacteremia caracteriza-se de forma insidiosa por fadiga, dores no corpo, perda de peso e com febre progressiva. A doença da arranhadura do gato manifesta-se inicialmente com uma pápula ou pústula cerca de uma semana no local de contato com animal (gato ou cão novo que arranha ou morde). Após 1 a 7 semanas aparece adenopatia regional e 1/3 dos pacientes apresentam febre e em 1/6 ocorre supuração do gânglio, sendo que a maioria evolui sem outros sintomas. A cura espontânea ocorre entre 2 a 4 meses. *B. quintanae* e *B. henselae* podem causar quadro de angiomatose bacilar caracterizado por proliferação neovascular envolvendo pele, gânglios e fígado. *B. elizabethae* ainda é pouco conhecida.

Afipia felis - foi considerada há alguns anos como o agente etiológico da doença da arranhadura do gato, que é hoje atribuída à *B. henselae*. Seu papel patogênico não está bem esclarecido.

Isolamento	<p>As bartonellas podem ser isoladas de hemoculturas, lesões cutâneas biópsias e gânglios. O SPS (polianetol sulfonato) que é o anticoagulante usado nas hemoculturas é inibidor das bartonellas, por isso deve-se usar outro anticoagulante.</p> <p>Quando há suspeita clínica, deve-se incubar por pelo menos sete dias, até 40 dias. Vários meios enriquecidos podem permitir o crescimento das bartonellas. O caldo infusão coração de preparo recente, com 5-10% de sangue desfibrinado de coelho ou cavalo são adequados, como também o ágar chocolate.</p> <p>No Bactec pode crescer, mas não aciona o alarme de CO₂. Exigem umidade a 35-37°C por 3 a 4 semanas. <i>B. bacilliformis</i> e <i>Afipia felis</i> crescem melhor entre 25 a 30°C.</p>
Identificação	<p>Colônias podem crescer rugosas ou lisas, de um mesmo material. São bacilos Gram negativos pequenos, às vezes curvos.</p> <p>As espécies <i>quintana</i> e <i>henselae</i>, que são mais isoladas, são caracterizados pelas seguintes provas: catalase e oxidase negativas, motilidade em lâmina presente e que não é devida a flagelos (não tem), mas a fímbrias, percebendo-se a agitação da célula. O período de incubação é longo (> que sete dias) e a <i>B. henselae</i> é bem aderente ao meio.</p>

Provas para diferenciação de espécies de *Bartonella* e de *A. felis*

Espécies	Catalase	Oxidase	Uréia	Flagelo	Motilidade
<i>B. bacilliformis</i>	+	neg	neg	+	+
<i>B. quintanae</i>	neg		neg	neg	+ *
<i>B. henselae</i>		neg	neg	neg	+ *
<i>B. elizabethae</i>	neg	neg	neg	neg	neg
<i>A. felis</i>		+	+	+	+

* Motilidade por fímbrias

BORDETELLA

Características gerais	O gênero <i>Bordetella</i> compreende as espécies <i>B. pertussis</i> , responsável pela coqueluche ou tosse comprida, e <i>B. parapertussis</i> , com quadro clínico semelhante a coqueluche, mas em geral menos severo. Ambas são patógenos exclusivos dos humanos. A <i>B. bronchiseptica</i> e <i>B. avium</i> são bactérias comensais de mamíferos e aves, causando infecções em cães (tosse dos
-------------------------------	---

Importância clínica	canis) e a <i>B. avium</i> rinotraqueíte em perus. São patógenos oportunistas para humanos que entram em contato com estes animais. Foram classificadas mais recentemente para o gênero <i>Bordetella</i> as espécies <i>holmesii</i> e <i>hinzii</i> .
Material clínico e Semeadura	São adequados o swab ou aspirado de nasofaringe e semeadura imediata em meios específicos e em ágar sangue para afastar <i>B. pertussis</i> . Na atualidade não se justifica dispor de meio de Bordet & Gengou ou outro, mas em caso de suspeita solicitar auxílio de Laboratório de Referência. Para fórmula de meios de cultura vide manuais de fabricantes de meios de cultura. A prova de imunofluorescência deve ser utilizada em material de nasofaringe juntamente com a cultura que é mais específica.
Isolamento e Identificação	São, cocobacilos Gram negativos pequenos e aeróbios estritos. A safranina deve ser corada pelo Gram durante 2 minutos para melhorar a coloração. Para <i>B. pertussis</i> e <i>parapertussis</i> os Laboratórios de Referência devem dispor de identificação sorológica para acelerar a identificação.

Provas diferenciais para espécies de *Bordetella*

Espécies	Oxidase	Motilidade	Uréia	Ágar Sangue e Chocolate	B & G ou Regan-Lowe	Salmonella -Shigella
<i>B. pertussis</i> ¹	+	neg	neg	neg	+ 3-6 dias	neg
<i>B. para pertussis</i>	neg	neg	+ em 24h	+	+ 2-3 dias	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	+ em 4h	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. avium</i>	+	+ ²	neg	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. holmesii</i>	neg	neg	neg	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. hinzii</i>	+	+	variável	+	+ 1-2 dias	+

¹- necessita de meio específico: Bordet & Gengou (infusão de batata + glicerol + sangue de carneiro) ou Regan Lowe.

²- mais evidente a 25°C

BRUCELLA

A brucelose é uma doença de sintomas vagos, que cursa de forma insidiosa com febre baixa, calafrios, sudorese noturna, cefaléia, mialgia e artralgia. Pode ser acompanhada na forma crônica de alterações hematológicas importantes como leucopenia, pancitopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, etc.

Importância clínica	Está associado à ingestão de leite e derivados e carne de mamíferos, à veterinários, açougueiros ou trabalhadores rurais que manipulam carne e sangue destes animais e à acidentes em laboratórios. A hemocultura exige tempo superior de 5-7 dias de incubação. É importante a informação médica de suspeita clínica para orientar o laboratório na pesquisa e caracterização do agente.
Material clínico e Semeadura	Sangue, aspirado de medula, aspirado e biópsia de gânglios, fígado, baço, LCR, etc. A partir do segundo dia de febre as hemoculturas podem ser positivas, ocorrendo também hemoculturas positivas em pacientes afebris. Outro recurso utilizado para facilitar o isolamento é o método de lise-centrifugação: <ul style="list-style-type: none"> - Colher 5 a 10mL de sangue em tubo de 50mL com 1,5mL de citrato de sódio a 4% - Adicionar cerca de 40mL de água destilada estéril - Centrifugar 2.000g por 30 minutos - Transferir 0,5mL do sedimento para uma placa de ágar sangue e semear. Pode-se fazer o mesmo com LCR e aspirado de medula. - Incubar 35°C em estufa entre 5 a 10% de CO₂ (com gerador de CO₂ ou estufa apropriada).
Isolamento e Identificação	As brucellas crescem bem em ágar sangue, ágar chocolate, Trypticase Soy Ágar e <i>Brucella</i> ágar. O crescimento é visível com 48 a 72 horas. Colônias são pequenas, brancas a creme, e ao Gram visualizam-se coco-bacilos bem finos e pequenos. São aeróbios OF oxidativos, crescem nos frascos de hemocultura, meio de Thayer Martin, ágar sangue, ágar chocolate,

mas não no Mc Conkey.

Espécies mais importantes são:

- *melitensis*, *abortus*, *suis* e *canis*.
- Uréia positivos: *B. suis* (1 a 30 minutos), *B. canis* (1 a 30 minutos) e *B. abortus* (1 a 2 h) no meio uréia de Christensen.
- H₂S com tira de acetato positivo: *B. abortus* e de *B. suis* (biotipo 1).
- CO₂ para crescimento: biotipos de *B. abortus* e *B. ovis*.

Provas diferenciais entre coco-bacilos Gram negativos

Bactéria	Oxidase	Motilidade	Uréia	Ágar Sangue	Mac Conkey
<i>Brucella</i> spp.	+	neg	+	+	neg
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	+	+	+	+	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	neg	neg	variável	+	+
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	+	neg	+	+	+
<i>Pasteurella</i> spp. *	+	neg	variável	+	neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	neg	variável	neg	neg

* cresce no TSI como fermentador acidificando ápice e base sem gás.

Considerando que a *Brucella* é de difícil caracterização em laboratório não especializado, encaminhar a laboratório de referência para confirmação. Suspeitar quando houver quadro clínico sugestivo, obtendo-se isolado de sangue ou medula, crescimento de coco-bacilos finos pouco corados, oxidase e catalase positivas, que crescem lentamente em ágar sangue ou chocolate. Soroaglutinação é útil como elemento da caracterização.

FRANCISELLA TULARENSIS

É um coco-bacilo pequeno, Gram negativo, imóvel e pleomórfico, aeróbio estrito e capsulado. Apresenta grande resistência no meio ambiente, sobrevivendo semanas em meios úmidos, carcaças de animais, água, lama, etc. Constitui o agente da tularemia, uma doença de animais selvagens e com vários vetores hematófagos. É transmitida principalmente por carrapatos, mas também por mosquitos.

Nos Estados Unidos prevalece o biovar A, mais grave, enquanto que no hemisfério sul prevalece o biovar B que apresenta a forma clínica mais leve, sendo pouco diagnosticada principalmente por desconhecimento do agente.

Fontes de transmissão	Centenas de animais silvestres, incluindo alguns domésticos (incluindo cães, gatos e pássaros), podem ser portadores deste agente. Cerca de uma dezena de diferentes insetos servem de vetores. A transmissão pode ocorrer também em contato direto com animais pela mordida, sangue, carne contaminada e eventualmente água e inalação de aerossóis.
Quadro clínico	<p>É extremamente infectante, devendo ser manipulado em cabine de segurança nível 2 para material clínico e nível 3 para culturas positivas. Bastam 10 microrganismos injetados por via subcutânea ou 25 inaladas para causar a doença.</p> <p>Logo após a penetração do agente, em geral pela pele, aparecem sintomas semelhantes da gripe: febre, tremores, cefaléia e dor generalizada. Após período de incubação de 2 a 10 dias forma-se uma úlcera no local de penetração, que pode durar meses. Os gânglios regionais aumentam e ocorre necrose. Se ocorrer invasão sanguínea, o quadro de endotoxemia típico se manifesta. Estes casos são pouco frequentes e ocorrem quando há grande inoculação ou paciente é imunocomprometido. A mortalidade alcança 60%, ocorrendo toxemia, cefaléia intensa, febre elevada e contínua, com delírios, prostração e choque.</p> <p>A forma úlcero-ganglionar ocorre em cerca de 80% dos casos relatados. A úlcera é endurecida, eritematosa, que não cicatriza. Outras formas relatadas são oculo-ganglionar, em orofaringe, ganglionar sem úlcera, pleuropulmonar e gastrointestinal.</p>

Material clínico e Semeadura	Os materiais que oferecem maior chance de positividade são a partir de raspados de úlceras, biópsias e escarro. A <i>Francisella</i> cresce em ágar chocolate suplementado com Isovitalex®. Laboratório de Referência deve ser consultado sobre recursos disponíveis ou encaminhamento de cepas suspeitas.
Isolamento e Identificação	A bacterioscopia de material clínico de lesões ou biópsias raramente ajuda, pois o microrganismo é muito pequeno e cora mal pelo método de Gram. Este agente deve ser lembrado sempre que houver doença associada a picada de carrapato e formação de úlcera com comprometimento ganglionar. Entretanto, o diagnóstico microbiológico é difícil, sendo na maioria das vezes feito com base em testes de aglutinação em amostras pareadas colhidas com intervalo de 2 a 3 semanas e congeladas a - 20°C.

HAEMOPHYLUS

Diferentes espécies pertencentes ao gênero *Haemophilus* podem ser encontradas como flora normal da nasofaringe e orofaringe, chegando a 50% da população, geralmente cepas não capsuladas, embora também cepas do *H. influenzae b* possam apenas representar colonização (rara nos adultos e cerca de 5% nas crianças).

Para considerar o isolamento de *Haemophilus* é fundamental associar o papel patogênico ao da clínica. Várias são as infecções causadas por *H. influenzae*, sendo *H. influenzae* do tipo b as cepas mais virulentas. Entretanto a partir da década passada, com a disponibilidade de vacinação, houve uma drástica redução na importância desta bactéria nas populações vacinadas.

- Doenças causadas pelo *H. influenzae b* principalmente na infância: Meningite, Epiglotite, Pericardite, Pneumonia, Artrite séptica, Osteomielite, Celulite facial.
- Mais raramente: peritonite e infecção urinária em crianças menores que cinco anos.
- Doenças causadas por cepas não b e não tipáveis (em maiores de 9 anos e adultos associados a doença de base predisponente como neoplasia, AIDS, alcoolismo, DPOC, etc.): Traqueobronquite e pneumonia, Bacteremia, Conjuntivite, Ootite (segunda causa depois do pneumococo), Sinusite.

HAEMOPHILUS APHROPHILUS

Microbiota do trato respiratório superior, especialmente em placas dentárias e sulco gengival; endocardite e abscesso cerebral e mais raramente meningite, pneumonia e bacteremia estão associados a este agente, particularmente em pacientes com comprometimento imunológico. A endocardite não está necessariamente relacionada à lesão valvular prévia, mas a associação com embolia arterial é frequente nestes casos. Existem relatos também de isolamento em otites, sinusites e epiglotites, etc.

Crescem bem em ágar chocolate no isolamento primário e em ágar sangue de carneiro nos subcultivos sem exigência de fatores X e V, mas as colônias são muito pequenas de cor amarelada, cheiro de cola e necessitam de 48 a 72h para boa visualização. Em caldo tem a característica de aderir as paredes do tubo, como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Não crescem em Mac Conkey. Para todos os hemófilos fazer o teste da beta-lactamase para verificar a resistência à penicilina

HAEMOPHILUS DUCREY

É o agente do cancro mole, sendo na atualidade raramente isolado, pela menor incidência da doença, da contaminação das lesões com flora genital e pelo frequente uso prévio de antibióticos.

Colhido de úlceras genitais removendo-se previamente a secreção superficial ou lavando com salina estéril e utilizando um swab. Recomenda-se semear imediatamente e fazer esfregaço a ser corado pelo Gram. Em geral é de difícil cultivo.

Emprega-se ágar chocolate de cavalo com base GC ou Mueller Hinton. A colocação de um disco de vancomicina pode ajudar a inibir bactérias Gram positivas. Na bacterioscopia aparecem coco-bacilos Gram lábeis agrupados e em cadeias como cardumes.

ISOLAMENTO

No isolamento primário no ágar chocolate as colônias costumam ser pequenas de cor beje claro, com odor característico. No ágar sangue ocasionalmente pode-se detectar o crescimento em torno de colônias de *Staphylococcus aureus*, que produz o fator V e é utilizada como prova alternativa à utilização dos discos e denominada prova do satelitismo.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *HAEMOPHILUS*

- Anaeróbio facultativo.
- Não crescem no TSI e no OF-glicose.
- Melhor meio de cultura para *haemophilus influenzae* é o ágar chocolate com sangue de cavalo. A base GC usada para *Neisserias* é indicada, embora os hemófilos cresçam com outras bases como Columbia e Mueller Hinton. Há necessidade de umidade e CO₂ entre 3 a 5% para o *H. influenzae* e *H. aphrophilus*. O ágar chocolate suporta muito bem o crescimento dos *haemophilus*, mas para outros fastidiosos recomenda-se adicionar suplemento de crescimento (vitox®, isovitalex®).
- As diferentes espécies de hemófilos podem dar reação de oxidase positiva fraca e demorada (cerca de 25 a 20 segundos).
- Em amostras de LCR pode ser útil a aglutinação com partículas de látex, mas a confirmação bioquímica e sorológica em laboratório de referência é necessária.
- Antibiograma é realizado em meio padronizado HTM (vide cap. meios de cultura).

PRINCIPAIS PROVAS PARA DIFERENCIAR ALGUMAS ESPÉCIES DE *HAEMOPHILUS*

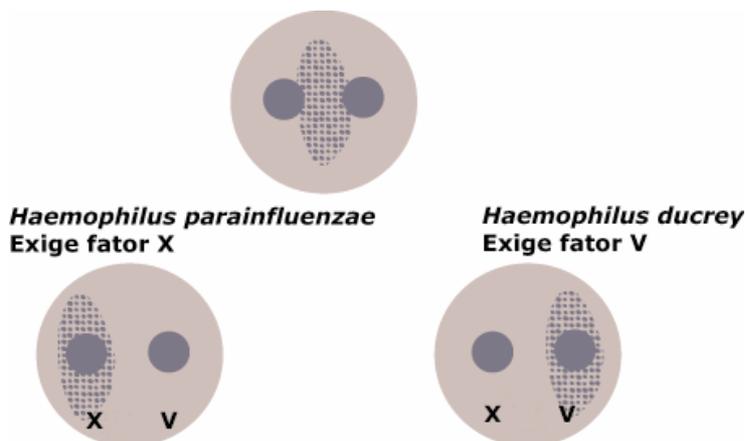
Espécies	Fator X	Fator V	Hemólise *	Uréia	Indol	GLI	SAC	LAC	Catalase
<i>H. influenzae</i>	+	+	neg	variável	variável	neg	neg	neg	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	variável	+	neg	neg	+
<i>H. parainfluenzae</i>	neg	+	neg	variável	variável	+	+	neg	variável
<i>H. ducrey</i>	+	neg	fraca	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<i>H. aphrophilus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	+	+	+	neg

* Verificar hemólise em ágar sangue de cavalo GLI = glicose SAC = sacarose LAC = lactose
 Obs.: Fermentação de açúcares com base CTA e 1% de açúcar adicionado de fator X e V (vide cap. meios de cultura); vide leitura de fatores X e V

Técnica para testar fatores X e V:

- Usar meio ágar tripticase soja ou BHI ágar.
- Discos comerciais impregnados com os fatores X=hemina/hematina e V=NAD ou coenzima I.
- Semear a bactéria como se fosse fazer um antibiograma e colocar os discos com pinça a uma distância de 1,5 cm um disco do outro. Flambar a pinça antes e após a retirada de cada disco.
- Após 24h de incubação em jarra com vela e umidade a 35°C, verificar crescimento próximo aos discos:

Haemophilus influenzae: Crescimento entre os discos (exige X e V)



Prova do satelitismo

- Semear com swab uma suspensão em salina cerca de 1 a 2 da escala Mac Farland no centro de uma placa de ágar sangue de carneiro.
- Semear em uma única estria um repique de *S. aureus* hemolítico (ATCC 23922).
- Incubar 18 a 24h em jarra com vela e umidade ou CO₂.
- Verificar crescimento de colônias pequenas próximas a zona de hemólise do estafilococo.
- Encaminhar cepas isoladas de líquidos nobres (sangue, LCR, pleural, pericárdico) a Laboratórios de Referência para confirmação e sorotipagem.

LEGIONELLA

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Pneumonia com ou sem sepsis é a manifestação clínica mais importante, podendo ocorrer infecções de partes moles e sinusite. Está em geral associada a surtos cuja fonte é a água contaminada com este agente. Largamente distribuída na natureza em ambiente úmido e água potável e ocasionalmente em chuveiros. Está associada a presença de outras bactérias e amebas de vida livre na água. A presença de bactérias do gênero *Legionella* em material clínico humano está invariavelmente associada à doença clínica.

ESPÉCIES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Existem algumas dezenas de espécies de *Legionella* sendo a espécie mais importante a *L. pneumophila*, sorogrupos 1 e 6. A doença pode ser sub-clínica, forma não pulmonar, pneumonia e doença extra-pulmonar. A forma não pulmonar tem período de incubação curto (horas a dias), sendo auto-limitada e sem evidências radiológicas de comprometimento pulmonar.

Os sintomas são febre, mal-estar, mialgia e tosse. A pneumonia é a forma mais frequente de manifestação da doença, acompanhada dos mesmos sintomas acima descritos para a forma não pulmonar e em geral com tosse não produtiva. A doença apresenta rápida progressão e nos casos graves, a formação de abscessos são sugestivos da legionelose. Bacteremia é comum e o comprometimento dos mais variados órgãos e tecidos já foi descrito.

MATERIAIS RECOMENDADOS

- Escarro
- Aspirado traqueal e outros que neste caso específico estão indicados como úteis
- Lavado/escovado bronco-alveolar.
- Biópsia pulmonar ou outros tecidos e aqueles obtidos em autópsia.
- LCR e outros líquidos de derrame.
- Urina (pesquisa de antígenos) – conservar a - 20°C.
- Para transporte: usar frasco estéril com água destilada estéril, mas não salina que pode inibir o cultivo. Sempre que possível concentrar os materiais por centrifugação, evitando formar aerossóis.

RECURSOS DIAGNÓSTICOS MAIS UTILIZADOS

Sensibilidade e especificidade de recursos diagnósticos para legionelose

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Observação
Cultura	70%	100%	Método de escolha
Agglutinação pelo látex	55-90%	85-99%	
Imunofluorescência indireta	70-80%	>95%	Útil com cultura ou fins epidemiológicos

Cultura em meio enriquecido	Cresce em meio suplementado com extrato de levedura, l-cisteína, sais de ferro e alfa-cetoglutarato em meio denominado BCYEa ou BCYE, e seu crescimento é favorecido pela incubação em 5% de CO ₂ . Para materiais com microbiota, como para secreção traqueal e escarro, acidificar o meio por 15 minutos a pH 2,0 com tampão ácido (0,2M HCl e 0,2M KCl) e em seguida neutralização a pH 7,0 com KOH 0,1N.
Cultura em meio seletivo	Recomenda-se uso de meio seletivo, adicionando ao meio BCYE os antibióticos: polimixina B, cefamandol e anisomicina ou vancomicina, polimixina B e anfotericina B. Colônias azuladas ou esverdeadas
Cultura em meio diferencial BCYE	Adicionado de glicina, vancomicina, púrpura de bromocresol e azul de bromotimol apresenta as seguintes características: <i>L. pneumophila</i> (branco esverdeado), <i>L. micdadei</i> (colônias azul claro ou acinzentadas), outras legionelas (colônias verde bem claro). Crescem bem no frasco utilizado pelo BACTEC®.

IDENTIFICAÇÃO

São bacilos Gram negativos finos que se coram fracamente pela fucsina e safranina do Gram. Em repiques tornam-se filamentosos.

PROVAS

- Aeróbio estrito
- No primo isolamento a l-cisteína é imprescindível.
- No meio BCYEa o crescimento pode ser observado a partir do 3 ao 5º dia a 35°C.
- Semear o material em ágar sangue como controle, pois a *Legionella* não deverá crescer.
- Aguardar 14 dias para descartar as culturas quando negativas.

CARACTERÍSTICAS DA *L. PNEUMOPHILA*

- oxidase positiva fraca
- catalase positiva
- não sacarolítico (não oxida nem fermenta os açúcares)
- motilidade positiva
- gelatinase positiva
- hidrólise do hipurato positivo
- sensível a macrolídeos, rifampicina, sulfatrim e quinolonas

A identificação com base em testes é difícil. O suspeito deve ser baseado na clínica, no aspecto da colônia, crescimento em meio BCYEa, dependência da l-cisteína, ausência de crescimento em ágar sangue e ágar chocolate não suplementados.

A imunofluorescência direta, com amostras clínicas utilizadas para cultura, é um método complementar para diagnóstico da legionelose. Encaminhar cepas suspeitas a Laboratório de referência para confirmação.

PASTEURELLA

A infecção pela *Pasteurella* constitui uma zoonose, pois se trata de bactéria microbiota de boca e trato respiratório superior de mamíferos e aves. As diferentes espécies estão associadas a infecções humanas relacionadas a mordida dos animais descritos abaixo ou outros tipos de contato com sangue, carne, carcaça, etc.

A *P. multocida* é a espécie mais comumente isolada em material clínico humano, em geral associada a mordida ou arranhadura de cães e gatos. Caracteriza-se pela formação de abscessos ou celulite e eventualmente osteomielite. Infecções respiratórias podem ocorrer, incluindo pneumonia lobar, com ou sem derrame e empiema. Em pacientes imunocomprometidos, com cirrose, neoplasias, podem apresentar bacteremia e septicemia.

Principais espécies de *Pasteurella* e doenças relacionadas

Bactéria	Doenças Relacionadas
<i>P. multocida</i>	Microbiota do trato respiratório de mamíferos e aves (domésticos e silvestres, encontrado na boca de cerca de 50% dos cães e gatos). Pode causar infecções em mamíferos e diarreia em aves.
<i>P. pneumotropica</i>	Trato respiratório de roedores, cães, gatos, etc
<i>P. haemolytica</i>	Infecções pulmonares em bovinos, mastite em ovelhas, sepsis em ovinos e caprinos.
<i>P. aerogenes</i>	Microbiota do trato intestinal de suínos
<i>P. dagmatis</i> (<i>n. sp1</i>)	Trato respiratório de cães e gatos

DIAGNÓSTICO DE ZOOSES

Para facilitar o isolamento e identificação da *Pasteurella* é muito importante a descrição clínica, pois na suspeita de zoonoses é importante lembrar de: brucelose, pasteurella, micobacterioses, tularemia, leptospirose, yersiniose, etc.

Caracterização microbiológica

- Coco-bacilo Gram negativo ou bacilos – podem ser capsulados
- Anaeróbio facultativo (fermentador) – TSI ácido/ácido
- Oxidase positiva em colônias isoladas em ágar sangue ou ágar chocolate
- Catalase positiva
- Motilidade negativa
- Indol positivo
- Sacarose positiva
- Muitas espécies são ornitina positivas

Provas diferenciais das espécies de *Pasteurella* spp. de importância clínica

Espécie *	Hemólise	Mac Conkey	Indol	Uréia	Ornitina	OF Glicose
<i>P. multocida</i>	neg	neg	+	neg	+	F sem gás
<i>P. pneumotropica</i>	neg	variável	+	+	+	F gás variável
<i>P. haemolytica</i>	+ 72%	variável	neg	neg	variável	F sem gás
<i>P. aerogenes</i>	neg	+	neg	+	variável	F sem gás
<i>P. dagmatis</i>	neg	neg	+	+	+	F com gás

* Todas são oxidase positiva, catalase positiva e fermentadoras da glicose

Obs.: a *P. multocida* cresce bem em ágar sangue de carneiro e ágar chocolate, formando pequenas colônias acinzentadas. Não cresce em ágar Mac Conkey. Tem odor forte característico e podem ser diferenciadas entre si por poucas provas (vide tabela acima), mas dependendo do animal-fonte, outras espécies menos frequentes podem estar envolvidas.

ACTINOBACILLUS

São habitantes das mucosas do trato respiratório e urinário de humanos e animais. As três espécies mais importantes são: *A. actinomycetemcomitans*, *A. urea* e *A. hominis*.

O primeiro está relacionado doença periodontal e particularmente à periodontite juvenil localizada, bem como com endocardite e abscesso cerebral, oriundos da boca. A doença periodontal está associada à endocardite pelos seguintes agentes:

- *A. actinomycetemcomitans*
- *Cardiobacterium hominis*
- *E. corrodens*
- *Kingella* spp.

As outras espécies de *Actinobacillus* são patógenos oportunistas e causam raramente infecções do trato respiratório e bacteremia.

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS PARA DIAGNÓSTICO

São coco-bacilos Gram negativos ou pequenos bacilos que crescem em aerobiose, umidade e 5 a 10% de CO₂ ou anaerobiose em ágar sangue e ágar chocolate. Recomenda-se adicionar suplementos com vitaminas e sangue lisado de carneiro ou cavalo ao ágar chocolate. As colônias ficam bem visíveis com 48 a 72 h de incubação, são brancas acinzentadas, com um pregueamento no centro, fortemente aderentes ao meio e pegajosas no primo isolamento.

Principais características das bactérias fastidiosas analisadas

Bactérias	Características Principais
<i>Actinobacillus</i>	Cocobacilos a bacilos longos, anaeróbios facultativos, colônias cinza, aderentes ao meio, com centro da colônia enrugado
<i>Cardiobacterium</i>	Bacilos que podem apresentar formas semelhantes à gota d'água
<i>Eikenella</i>	Cocobacilos com extremidades arredondadas, cheiro de água clorada, colônias podem corroer o meio
<i>Kingella</i>	Pequenos cocobacilos
<i>Capnocytophaga</i>	Fusifforme e curvo, colônias crescem espalhadas
<i>Streptobacillus</i>	Filamentos longos
<i>Chromobacterium</i>	Pode ter forte pigmento violeta, cresce em Mac Conkey

Provas diferenciais entre os principais fastidiosos

Bactérias	Oxidase	Catalase	CO ₂	Mac Conkey	Uréia	Indol	Glic.	TSI	Motil.
<i>Actinobacillus</i> ¹	neg ou + fraco	+	+	variável	neg	neg	+	ac / ac	neg
<i>Cardiobacterium</i>	+	neg	+	neg	neg	+	+	ac / ac	neg
<i>Eikenella</i>	+	neg	+	neg	neg	neg	neg	alcalino	neg
<i>Kingella</i>	+	neg	+	neg	neg	neg	+	alcalino	neg
<i>Capnocytophaga</i>	neg ²	neg ²	+	neg	neg	neg	+	n cresc. ³	neg
<i>Streptobacillus</i>	neg	neg	+	neg	neg	neg	+	n cresce	neg
<i>Chromobacterium</i>	variável	+	neg	+	neg	neg	+	alc / ac	+

positivo ou neg = 80% ou mais das provas positivas ou negativas ac= ácido alc = alcalino

¹ - *A. actinomycetemcomitans*

² - origem humana. As de origem animal são oxidase e catalase positivas.

³ - pode acidificar lentamente

CAPNOCYTOPHAGA

As espécies de *Capnocytophaga gingivalis*, *granulosa*, *haemolytica*, *ochracea* e *sputigena* fazem parte da microbiota da cavidade oral humana, enquanto outras espécies podem ser encontradas na boca de animais domésticos. O isolamento de *Capnocytophaga* ocorre com maior frequência em bacteremias nos pacientes neutropênicos com mucosite, mas estão também implicadas na doença periodontal juvenil (*gingivalis* e *ochracea*), periodontite em adultos (*sputigena*) e isoladas em placas dentais supragengivais em adultos (*granulosa* e *haemolytica*). As doenças localizadas (ceratites, abscessos e endoftalmite), bem como doenças sistêmicas (septicemia, endocardite, osteomielite, etc.) ocorrem em pacientes imunocomprometidos ou não.

MORFOLOGIA E CULTIVO

A morfologia da *Capnocytophaga* é bem característica, facilitando a sua suspeita, pois lembra um *Fusobacterium* aerotolerante. Tem as extremidades afiladas e o centro mais largo, podendo ser encurvada e eventualmente cocóide.

Para cultivo, crescem melhores com 5 a 10% de CO₂ e em anaerobiose, o que pode confundir com o anaeróbio estrito, se não for feita a prova de crescimento em aerobiose com CO₂. Chama a atenção o fato de crescer melhor em ágar sangue de carneiro que no ágar chocolate sem suplemento de vitaminas. Não crescem em Mac Conkey. O crescimento pode ocorrer com 24 a 72 h. A colônia é chata e sua borda é irregular; com maior incubação nota-se o espalhamento em torno da colônia, semelhante ao *Proteus*, mas em escala muito reduzida, cerca de 2 a 4 mm de diâmetro. A espécie *haemolytica* apresenta hemólise discreta, e a espécie *ochracea* tem cheiro de amêndoas.

IDENTIFICAÇÃO

Capnocytophaga de origem humana são oxidase e catalase negativas, produzem ácido a partir da glicose em caldo enriquecido com soro de coelho e inóculo denso. Motilidade negativa; indol negativo; lisina, ornitina e arginina negativas. A maioria é esculina positiva (*gingivalis* é variável e *granulosa* negativa). A diferenciação das espécies é difícil. As amostras de origem animal (*C. canimorsus* e *cynodegmi*) são oxidase, catalase e arginina positivas.

EIKENELLA

Também é bactéria da microbiota da cavidade oral humana e atribue-se participação em infecções periodontais, sendo encontrada na placa bacteriana subgengival em adultos com periodontite. Isolada em material de trato respiratório inferior, abscessos de partes moles, sangue e fluídos estéreis infectados em casos de infecções pleuronegumonares, infecções pós-cirúrgicas de parede, artrite, meningite, endocardite e septicemia.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

É anaeróbio facultativo, mas cresce melhor com 5% de CO₂, em ágar sangue e chocolate, mas não em Mac Conkey. O crescimento é lento, necessitando de 2 a 4 dias para boa visualização das colônias. Em cerca da metade das cepas pode-se observar a corrosão do ágar, que é sua característica marcante. Produz um pigmento amarelo claro e tem odor de hipoclorito no ágar sangue e ágar chocolate.

Na bacterioscopia são observados bacilos delgados ou coco-bacilos gram negativos com extremidades arredondadas. E, bioquimicamente, caracteriza-se por ser oxidase positiva, catalase negativa, motilidade negativa e ornitina positiva; provas negativas de utilização de carboidratos, uréia, indol e esculina.

KINGELLA

Espécies de *Kingella* fazem parte do trato respiratório e genito-urinário humanos. *K. kingae* é a espécie mais importante e é um patógeno oportunista responsável por casos graves de endocardite, osteomielite, septicemia, com provável porta de entrada em lesões da mucosa da orofaringe. A doença valvular pode estar ou não associada a doença cardíaca prévia. A osteomielite ocorre com

maior frequência em crianças menores de 5 anos. Os quadros sépticos podem ser semelhantes à doença meningocócica.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

A *K. kingae* cresce em ágar sangue e ágar chocolate com 5% de CO₂, após pelo menos 48 h de incubação, mas não em Mac Conkey. Tem como característica ser beta-hemolítica no ágar sangue de carneiro, mas sem hemólise intensa. Pode crescer numa mesma placa de isolamento como colônias lisas e convexas ou fazendo corrosão, ou colônias espalhadas como se fossem móveis.

São coco-bacilos que ocorrem aos pares ou cadeias curtas, podendo ser confundida com *Neisseria* spp. e, bioquimicamente, são oxidase positiva, motilidade e catalase negativas, e acidificam a glicose lentamente.

Provas diferenciais entre os fastidiosos oxidase positivas e catalase negativas: Fastidiosos oxidase positivas e catalase, uréia e esculina negativas

Bactérias	Hemólise	Indol	Ornitina	Glicose
<i>C. hominis</i>	neg	+	neg	+
<i>E. corrodens</i>	neg	neg	+	neg
<i>K. kingae</i>	+	neg	neg	+

CARDIOBACTERIUM HOMINIS

Cardiobacterium é flora do trato respiratório humano e ocasionalmente do trato urogenital. Está associado quase exclusivamente a quadros de endocardite, precedidos de manipulação dentária.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

Cresce em 3 a 5 dias em hemoculturas, mas não causa alterações no meio (turvação, hemólise, película, grumos, etc.). Cresce em 3 a 5 dias em 5 a 7% de CO₂, em ágar sangue e ágar chocolate, mas não em Mac Conkey. As colônias são branco-amareladas e podem manifestar um pequeno espriamento da colônia simulando motilidade no ágar como o *Proteus* e eventualmente a corrosão do ágar.

São bacilos Gram negativos, podendo apresentar pleomorfismo com extremidades dilatadas como bulbos que podem reter corante violeta e com arranjos característicos em agrupamentos de rosetas e formas isoladas como gota d'água ou alteres. Deve-se observar estas características para não confundir com bacilos Gram positivos.

Uma prova fundamental é a produção de indol, que deve ser feita em caldo triptona, com inóculo denso, incubação de 48 h, e extração com xilol e uso do reagente de Ehrlich.

CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM

Encontrada na natureza no solo e na água, a infecção em geral está relacionada a lesões cutâneas com estes elementos. Lesões localizadas ou formas septicêmicas graves com múltiplos abscessos têm sido esporadicamente relatadas. Mais raramente diarreia e infecção urinária.

CULTIVO E BACTERIOSCOPIA

Bacilo Gram negativo anaeróbio facultativo, reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondadas, isolados ou em arranjos aos pares ou em cadeias curtas.

Diferente da maioria dos fastidiosos, cresce além do ágar sangue e chocolate, também em Mac Conkey. Característica de colônia convexa, lisa e de cor violeta forte, embora algumas variantes sem cor possam ocorrer. Algumas cepas podem ser levemente hemolíticas no ágar sangue.

STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS

Encontrado na nasofaringe e orofaringe de ratos, camundongos e outros roedores domésticos como a cobaia. As infecções estão relacionadas a mordida destes roedores ou ingestão de leite ou alimentos contaminados. A febre por mordedura do rato apresenta quadro clínico bem definido com período de incubação de cerca de 10 dias, início abrupto com febre elevada, tremores, cefaléia intensa, vômitos e artralgia migratória.

Rash semelhante ao sarampo com erupções maculopapulares podendo ser pustulosa, com petéquias ou púrpuras nas extremidades, incluindo região palmar e plantar. Complicações graves podem ocorrer como endocardite, pericardite, septicemia, abscesso cerebral, etc. Sem tratamento pode evoluir favoravelmente em 2 semanas ou pode se tornar crônica; a mortalidade chega a 10%.

CULTIVO, BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

É um bacilo Gram negativo muito pleomórfico, podendo ter em culturas mais velhas de 1 a 150 µm de comprimento (habitualmente bactérias tem de 1 a 3 µm), com eventuais dilatações como um colar de pérolas, sem apresentar ramificações, quebrando em formas coco-bacilares. Em culturas jovens pode ter morfologia mais uniforme. O isolamento é feito de hemocultura, aspirado de derrames (devem ser centrifugados para concentrá-los) e abscessos.

Meios de cultivo

- Colher sangue para hemocultura com citrato. Não se deve usar hemoculturas com SPS que é inibidor do *S. moniliformis*.
- Cultivar em meio bifásico TSA/TSB ou ágar infusão coração ou caldo infusão coração, suplementados com 10% de soro de cavalo ou 15% de soro de coelho, e 0,5% de extrato de levedura.
- Incubar em jarra de anaerobiose ou 10% CO₂ a 35-36°C e umidade.

Após cerca de três dias crescem colônias cinzas de 1-2 mm de diâmetro, consistência butirosa podendo surgir colônias variantes com aparência de ovo frito como micoplasmas. Em caldo de cultura crescem em 2 a 3 dias com aparência de bolas de pêlo.

As provas bioquímicas exigem a adição de soro de cavalo ou coelho para suportar o crescimento. São oxidase, catalase, indol e uréia negativos; e positivos para esculina, H₂S com a prova da tira de acetato de chumbo e hidrólise da arginina. Acidificam lentamente a glicose em base CTA com 0,5% de soro de cavalo.

8. BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS

INTRODUÇÃO

Existe um grupo de bactérias, que produz patologia no ser humano, e que não tem capacidade de multiplicar-se em presença do oxigênio atmosférico. E mais, para muitas espécies destas bactérias o oxigênio é deletério. Estas bactérias são chamadas de anaeróbios estritos, para diferenciá-las dos chamados anaeróbios facultativos, que têm a capacidade de desenvolver seus processos metabólicos, tanto em presença como na ausência do oxigênio. A maior parte das bactérias patogênicas do ser humano são anaeróbios facultativos e as famílias *Micrococaceae*, *Streptococaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, são exemplos destes microrganismos.

Os anaeróbios estritos estão constituídos por numerosas famílias, gêneros e espécies com caracteres morfológicos como H_2O_2 que se formam em presença de oxigênio e que podem ser tóxicos, bioquímicos e antigênicos muito diferentes. São estudados em capítulo separado porque a metodologia para seu isolamento e identificação laboratorial é própria deste grupo, e porque produzem alguns tipos especiais de processos patológicos no ser humano.

Existem várias teorias que tentam explicar esta susceptibilidade dos anaeróbios estritos ao oxigênio. Entre elas, as seguintes:

- Oxigênio seria um tóxico direto para a bactéria anaeróbia.
- As bactérias anaeróbias estritas não têm a enzima catalase que impede a formação de grandes quantidades de peróxidos.
- Oxigênio altera enzimas bacterianas importantes no metabolismo (oxida, por exemplo, enzimas que contêm sh).
- As bactérias anaeróbias estritas não possuem a enzima superóxido dismutase, capaz de transformar o radical, o que é altamente tóxico para a bactéria.

Existem vários argumentos a favor ou contra estas teorias. Provavelmente mais de um destes fatores seja importante para explicar a ação deletéria do oxigênio nestas bactérias.

Esta labilidade dos anaeróbios estritos ao oxigênio explica a dificuldade existente nos laboratórios para seu isolamento e estudo. Por este motivo também, boa parte das infecções provocadas por estes microrganismos não eram diagnosticadas até a década de 1970, quando foram desenvolvidos procedimentos práticos de laboratórios para criar atmosferas de anaerobiose. Assim, as infecções provocadas pelos microrganismos mais resistentes dentro deste grupo, os esporulados do gênero *Clostridium*, eram diagnosticadas com maior frequência. Hoje sabemos que as infecções por *Clostridium* são menos frequentes que as infecções provocadas por outros gêneros de bactérias anaeróbias.

Um fato que também merece ser destacado, para explicar a frequência com que estas bactérias provocam infecção, é que os anaeróbios estritos são habitantes normais do organismo humano, ultrapassando em número os aeróbios e anaeróbios facultativos. Assim, os anaeróbios estritos estão em proporções 5 a 1000 vezes maiores que os anaeróbios facultativos na microbiota normal do tubo digestivo, pele, trato respiratório superior e genital feminino.

Quando existem fatores predisponentes estas bactérias provocam processos patológicos em diferentes órgãos e sistemas. Por este motivo, a maior parte das infecções provocadas pelas bactérias anaeróbias estritas são infecções chamadas endógenas. É a própria microbiota bacteriana do doente que em determinado momento provoca o processo infeccioso, sendo este tipo de infecção pouco ou não contagioso. As infecções provocadas pelo gênero *Clostridium* são fundamentalmente adquiridas a partir do meio ambiente externo e por este motivo são chamadas de infecções exógenas.

Nas mucosas, onde os anaeróbios estritos formam parte da flora normal, existem condições locais de anaerobiose. Estas condições são provocadas por compostos orgânicos, enzimas, restos celulares e bactérias anaeróbias facultativas que baixam o potencial redox nestes locais. Neste sentido devemos assinalar que estas bactérias toleram pequenas quantidades de oxigênio. As mais estritas crescem em atmosferas com 0,5% de oxigênio, muitas crescem em atmosferas ao redor de 3% e algumas podem crescer ainda em concentrações de até 8% de oxigênio.

Como as bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias favorecem a multiplicação dos anaeróbios, por consumirem o oxigênio existente no local e talvez por produzirem alguns fatores de crescimento como substâncias secundárias do seu metabolismo, a maior parte das infecções por bactérias anaeróbias estritas são infecções mistas. Assim, são frequentes as infecções conjuntas com Enterobactérias, *Pseudomonas* e *Staphylococcus aureus*.

Alguns aspectos clínicos fazem suspeitar uma infecção com envolvimento de bactérias anaeróbias, sendo os principais estes abaixo relacionados:

- Secreção fétida
- Infecção nas proximidades de superfície mucosa
- Tecido necrótico
- Presença de gás em tecidos ou secreções
- Tromboflebite séptica
- Coloração negra em secreção com sangue
- Infecção decorrente de mordida humana ou de animal
- Presença de grânulos de enxofre nas secreções
- Terapêutica prévia com aminoglicosídeos
- Gangrena gasosa

Uma lesão com aspecto de um micetoma e a observação de grânulos de enxofre no pus obtido são característica de uma infecção por *Actinomyces*. A infecção por anaeróbios secundária a uma mordida de animal ou do ser humano é explicada pela existência de um grande número destas bactérias na cavidade oral destes hospedeiros. Associados a estes elementos clínicos, existem alguns outros, laboratoriais, que sedimentam ainda mais a suspeita de uma infecção por anaeróbios estritos:

- Ocorrência de formas pleomórficas na coloração de Gram (como regra geral, os anaeróbios são mais pleomórficos que os aeróbios e anaeróbios facultativos).
- Observação no material, de bacilos gram positivos esporulados que fazem pensar em *Clostridium*.
- Presença de bactérias no Gram direto, que não crescem nos meios mantidos em atmosferas de aerobiose.
- Crescimento de bactérias somente na parte inferior de tubos com meios de cultura líquido ou semi-sólido.

FATORES PREDISPOANTES

Uma variedade de condições predispõe um indivíduo a desenvolver infecção por anaeróbios. Podemos generalizar dizendo que todos os fatores que fazem diminuir a quantidade de oxigênio nos tecidos, e, portanto, o potencial de oxi-redução dos mesmos, favorecem a infecção por anaeróbios estritos. Entre estes fatores podemos assinalar como mais frequentes os seguintes:

- Diminuição do fluxo sanguíneo.
- Presença de áreas necróticas.
- Corpos estranhos.
- Acúmulo de sais endógenos (por exemplo, pontos de calcificação).
- Infecção por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas.
- Manipulações cirúrgicas.
- Esterilização intestinal pré-operatória.
- Tumores, processos orgânicos ou caseosos.

Um baixo potencial de oxi-redução facilita o crescimento de bactérias anaeróbias e a causa clínica mais comum de diminuição do potencial redox é a anóxia dos tecidos resultante de lesão vascular, compressão, hipotermia, choque, edema e outras condições levando à má perfusão.

Quanto às doenças sistêmicas ou condições gerais como corticoterapia, terapêutica de tumores, leucopenia, hipergamaglobulinemia, colagenoses, diabetes, esplenectomias, embora relacionadas

como predisponentes, não há evidência concreta de que realmente estejam associadas à maior incidência de infecção por anaeróbios.

COLETA DE MATERIAL

As amostras devem ser colhidas de forma que não entrem em contato com oxigênio e não se contaminem com bactérias anaeróbias da flora normal. Por este motivo devem ser aspiradas com seringa, da qual é eliminado o ar imediatamente após a obtenção da amostra.

O material não pode ser colhido com zaragatoa (swab). Para evitar a contaminação pelos anaeróbios da flora normal, não devem ser semeados escarro, secreção faríngea ou nasal, secreções vaginais, fezes ou material de colostomia, pois estes materiais sempre têm bactérias anaeróbias. Idealmente, as bactérias anaeróbias estritas são pesquisadas em líquidos aspirados de cavidades fechadas, material obtido por aspiração profunda de feridas, punção de traquéia ou pulmonar e sangue para hemocultura.

Em resumo, serve qualquer material que não esteja normalmente contaminado com as bactérias anaeróbias da flora normal.

TRANSPORTE DO MATERIAL

O transporte pode ser feito com a mesma seringa com que foi colhido o material. Obviamente que este transporte deve ser o mais rápido possível. O melhor é que a mesmo profissional que colheu leve imediatamente a seringa ao laboratório.

Também pode ser empregado, com este fim, um vidro do tipo de penicilina, que contém meio de tioglicolato de sódio (± 7 ml). O tioglicolato é um sal redutor, de forma que no interior do meio existem condições de anaerobiose. A este meio líquido pode acrescentar uma pequena quantidade de ágar (0,5%) para transformá-lo em um meio mais espesso, o que dificulta a difusão de oxigênio. O meio tem um indicador de oxigenação que é a rezarsurina, de modo que se por algum motivo existe oxigenação do mesmo, o indicador adquire cor rosa.

O material aspirado é inoculado no interior do meio de cultura, através da tampa de borracha. Especial cuidado deve ter-se para não agitar o meio, antes e depois da inoculação, para evitar sua oxigenação.

As amostras colhidas neste meio podem ser encaminhadas ao laboratório várias horas após sua inoculação (até 24 horas).

PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Sempre é feita uma coloração de Gram e de esporos, quando necessário, da amostra recebida, o que pode orientar o clínico para o diagnóstico e a terapêutica precoce. Por exemplo, a observação num processo com aspecto de gangrena gasosa de bacilos gram positivos, grandes esporulados, é quase confirmação do diagnóstico de *Clostridium* e de gangrena gasosa.

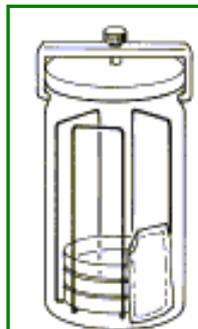
A existência de poucas ou muitas bactérias na amostra permite orientar o bacteriologista se ele deve enriquecer previamente a amostra em um caldo ou fazer diretamente a semeadura em placa. Quando o material vem numa seringa, a semeadura é feita em tioglicolato e em placa. Quando o material já vem no meio de tioglicolato, é feita, a partir deste, a semeadura em placa, e incubados ambos os meios.

PRODUÇÃO DE ANAEROBIOSE

Existem vários procedimentos para conseguir no laboratório uma atmosfera de anaerobiose adequada à multiplicação das bactérias anaeróbias produtoras de patologia no ser humano. Por exemplo:

- Uso de tubos com meios sólidos pré-reduzidos.

- Câmaras anaeróbias (glove box), nas quais o manipulador introduz somente as mãos, sendo o ar eliminado, colocando-se uma mistura de gases (H_2 , CO_2 , N_2); nestas câmaras existem todos os elementos necessários para o trabalho bacteriológico, incluindo estufas de incubação.
- Sistema mais empregado é o sistema das jarras de anaerobiose com geradores químicos que permitem obter uma atmosfera adequada para a multiplicação destas bactérias. Existem diversos tipos de geradores. Os mais utilizados são os que provocam um consumo do oxigênio com substâncias redutoras como ferro reduzido ou ácido ascórbico.



Dentro da jarra é colocado, além dos geradores químicos, uma fita de papel filtro impregnada de azul de metileno, que é um indicador de anaerobiose. Quando a atmosfera do interior da jarra tem condições adequadas de anaerobiose, o azul de metileno altera para uma cor branca.

Numa jarra de tamanho médio 2,5 litros, coloca-se aproximadamente 10 placas e muitos tubos. Com estes sistemas o conteúdo de O_2 da jarra cai a 0,4%, em aproximadamente 1 hora e meia, de forma que as condições anaeróbias estão presentes bem antes da transformação do azul de metileno, que acontece por volta de 4-6 horas.

Observar uma jarra com placas semeadas, um gerador de anaerobiose sobre a última placa, e o indicador de anaerobiose reduzido de cor branca. Comparar esta cor com a cor azul do indicador nos geradores localizados fora da jarra em sua parte inferior.

Os métodos citados acima dão resultados semelhantes quanto à eficácia do isolamento de bactérias anaeróbias em amostras clínicas, porém, o sistema das jarras é o mais prático e menos complicado.

SEMEADURA EM PLACA

As amostras são semeadas em três placas de ágar sangue preparadas com ágar *Brucella*, adicionadas com 10% de sangue de carneiro. Uma das placas é incubada a 37°C em atmosfera aeróbia, e uma segunda é incubada a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO_2 para bactérias microaerófilas. Para este fim colocamos a placa em uma jarra com um gerador de CO_2 , produzindo aproximadamente 5% de CO_2 . A terceira placa é a que se inocula em atmosfera de anaerobiose. O meio de cultura desta terceira placa é enriquecido com hemina (5mg/ml), vitamina K (10 mg/ml) e extrato de levedura (0,5%). Neste meio acrescenta-se também um antibiótico aminoglicosídeo (geralmente amicacina, 100 mcg/ml).

A adição do antibiótico cria um meio seletivo porque os anaeróbios estritos são resistentes a estes antimicrobianos e a maior parte das cepas de aeróbios e anaeróbios facultativos é sensível. Como a maior parte das infecções provocadas pelos anaeróbios estritos são infecções mistas, este meio seletivo ajuda o isolamento bacteriano. Não se justifica o uso de mais uma placa sem antibiótico porque aumentam os custos sem aumentar o isolamento de anaeróbios.

Estas placas são incubadas dentro da jarra a 37°C de temperatura durante 48 horas. Quando se suspeita, pelo quadro clínico ou pela coloração de Gram da amostra, que estamos em presença de uma infecção por *Clostridium*, que são de crescimento mais rápido, as jarras podem ser abertas após 18 a 24 horas de incubação.

Por outro lado, bactérias de crescimento mais lento, como os actinomicetos, podem demorar sete dias ou mais para formar colônias visíveis.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

COMPROVAÇÃO DE ANAEROBIOSE ESTRITA

Após a incubação, as placas são examinadas e agora o passo mais importante é a comprovação de que as bactérias desenvolvidas nas placas de anaerobiose são anaeróbios estritos.

Para este fim, são feitas colorações de Gram, de todos os diferentes tipos de colônias observadas nas três placas e comparada a morfologia bacteriana. Ao mesmo tempo, semeia-se as diversas bactérias obtidas, novamente em anaerobiose e aerobiose.

Só é feito o diagnóstico de anaeróbio estrito quando, após 24 a 48 horas da nova incubação, a bactéria apenas crescer na placa de anaerobiose. O Gram das colônias já orienta para uma identificação preliminar do grupo de anaeróbio isolado.

Agrupamento das bactérias anaeróbias estritas, de importância em patologia humana de acordo com sua morfologia na coloração de Gram

Cocos Gram positivos

Staphylococcus
Peptostreptococcus
Streptococcus

Cocos Gram negativos

Veillonella
Acidaminococcus
Megasphaera

Bacilos Gram positivos não esporulados

Propionibacterium
Bifidobacterium
Actinomyces
Eubacterium
Lactobacillus

Bacilos Gram positivos esporulados

Clostridium

Bacilos Gram negativos

Bacteróides
Fusobacterium
Prevotella
Porphyromonas

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PRESUNTIVA

Das colônias de anaeróbios estritos, deve ser feita coloração de Gram. Já nesta etapa o laboratório presta uma grande ajuda ao clínico, informando que o paciente tem uma infecção por uma bactéria anaeróbia estrita que pertence a determinado grupo morfológico.

O diagnóstico de gênero e espécie é feito utilizando:

- Provas bioquímicas: utilização de açúcares, produção de indol, redução de nitratos, urease, crescimento em presença de bile, liquefação da gelatina, hidrólise de esculina etc.
- Produção de pigmentos
- Hemólise
- Aprofundamento no ágar
- Susceptibilidade a antimicrobianos
- Formação de ácidos detectados por cromatografia líquida
- Inoculação experimental
- Sorologia

As seguintes considerações práticas são úteis para a orientação do clínico para uma conduta adequada, sem a necessidade de aparelhos ou metodologias caras por parte do laboratório:

- Na presença de cocos Gram positivos, o laboratório deve fazer o diagnóstico presuntivo de *Peptostreptococcus* que são os mais freqüentemente isolados neste grupo morfológico.
- Diagnóstico diferencial com *Streptococcus* e *Staphylococcus* anaeróbios como das espécies de *Peptostreptococcus* deve ser feita com ajuda da cromatografia para detectar a produção de diferentes ácidos graxos.
- Na presença de cocos Gram negativos, o laboratório deve fazer o diagnóstico presuntivo de *Veillonella*, gênero mais freqüente neste grupo. Para o diagnóstico diferencial com os outros gêneros de cocos Gram negativos também é recomendada a cromatografia líquida, para pesquisar ácidos graxos.
- Na presença de bacilos Gram positivos esporulados, o laboratório deve fazer o diagnóstico de *Clostridium*.
- Na dúvida no diagnóstico de bacilo esporulado, recomenda-se o tratamento com álcool etílico a 95%, durante 1 hora à temperatura ambiente e ressemeadura posterior. Além disso, a suspensão bacteriana pode ser aquecida a 80°C durante 10 minutos, esfriada e feita ressemeadura. Após um ou outro destes procedimentos, só sobrevivem bactérias esporuladas.
- Se o *Clostridium* produzir um duplo halo de hemólise pode ser feito o diagnóstico presuntivo de *Clostridium perfringens*. Esta espécie é a mais freqüentemente isolada dentro deste grupo bacteriano.

- Para o diagnóstico diferencial das outras espécies de *Clostridium* devem ser feitas provas bioquímicas como hidrólise da gelatina, fermentação da glicose, lecitinase, lipase, produção de indol, uréia, nitratos, e motilidade.
- Na presença de bacilos Gram positivos não esporulados recomendamos fazer a prova de catalase, redução de nitratos, hidrólise de esculina, urease, e produção de pigmento. Para o diagnóstico definitivo, deve ser feita a pesquisa da produção de ácidos graxos.
- Se a coloração de Gram mostrar bacilos Gram negativos, recomendamos semear a colônia em ágar sangue (Brucella ágar), colocando um disco de Rifampicina (15 mcg) e um disco de Kanamicina (1.000 mcg); a bactéria deve também ser semeada num meio que contém bile a 20%, e num meio rico em triptofano para determinar a produção de indol, com as placas incubadas por 48 horas a 37°C.
- Estas provas junto com a produção de pigmento permitem fazer o diagnóstico presuntivo de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.
- Frente aos discos de antibióticos, a bactéria é considerada sensível se o halo de inibição é de 12 mm ou maior; considerada resistente com halos menores de 12 mm.
- Como inóculo para a semeadura utiliza-se uma suspensão com turvação semelhante ao número 3 de escala de MC Farland ou uma turvação semelhante após incubação em meio de tioglicolato.
- A prova da bile é considerada positiva, se existir crescimento bacteriano no quadrante respectivo. Para a produção de pigmento, recomendamos a observação direta das colônias, e, em caso de não existir pigmento evidente, iluminar a placa com luz ultravioleta (± 360 nm de comprimento de onda). Colônias de *Prevotella melaninogenicus* aparecem de cor tijolo avermelhado.
- Para a prova de indol, recomendamos passar uma colônia, a partir do meio com triptofano, com ajuda de uma alça de platina num papel filtro impregnado em 1% de paradimetilaminocinamaldeído (em ácido clorídrico 10%). Uma reação positiva produz imediatamente uma cor azul.

O diagnóstico presuntivo é feito de acordo à seguinte tabela:

Bacilos Gram negativos anaeróbios estritos

Bactérias	Rifampicin a 15 mcg	Kanamicin a 1.000 mcg	Bile 20%	Indol	Pigmento
<i>Bacteroides grupo fragilis</i>	sensível	resistente	+	+/-neg	neg
<i>Prevotella sp</i>	sensível	resistente	neg	+/-neg	+
<i>Porphyromonas sp</i>	sensível	resistente	neg	+	+
<i>Bacteróides sp</i>	sensível	sensível-resistente	neg	neg	neg
<i>F.mortiferum</i>	resistente	sensível	+	neg	neg
<i>F.varium</i>	resistente	sensível	+	+	neg
<i>Fusobacterium spp.</i>	sensível	sensível	neg	+	neg

Para Rifampicina e Kanamicina:

Sensível = halo de inibição com 12 mm ou mais de diâmetro

Resistente = ausência de halo ou menor que 12 mm de diâmetro.

- A diferenciação dos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas* é realizada através da capacidade de fermentar glicose que é positiva para o primeiro gênero e negativa para o segundo.
- Alguns sistemas comerciais manuais ou automatizados permitem fazer o diagnóstico das diferentes espécies de anaeróbios utilizando numerosas provas bioquímicas.
- Alguns utilizando a ação de enzimas bacterianas pré-formadas podem fazer este diagnóstico após 4 horas de incubação. Destes os mais freqüentemente utilizados são:
 - API®, Vitek® e Microscan®. Estes sistemas mais caros não são fundamentais para o diagnóstico dos grupos bacterianos e para uma orientação terapêutica adequada.

- Em algumas infecções é importante, para o diagnóstico, determinar a presença de toxinas como acontece nas infecções intestinais por *Clostridium difficile*. Esta determinação é feita com provas sorológicas disponíveis comercialmente.

PROVAS DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O estudo da sensibilidade destas bactérias é importante pelo aumento permanente de sua resistência frente aos diferentes antimicrobianos. Esta resistência é mais comum nos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, mas pode estar presente também nos gêneros *Clostridium*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

Método do Disco

O método do disco difusão não é adequado para estudar a sensibilidade das bactérias anaeróbias estritas. O NCCLS (National Committee for Clinical Laboratories Standards) dos EUA recomenda um método de diluição em ágar: as concentrações de antimicrobianos são incorporadas no meio de Wilkins-Chalgren. Cada placa tem uma concentração de um antimicrobiano. As bactérias são semeadas utilizando o inoculador múltiplo de "Steers" e as placas colocadas em jarras com gerador de anaerobiose. A leitura é feita após 48 horas de incubação na estufa, determinando-se a CIM (concentração inibitória mínima).

Método da Fita

Um método alternativo mais prático é a determinação da sensibilidade utilizando fitas de plástico impregnadas com um gradiente de concentração de antimicrobianos como no método do E test®. As bactérias são semeadas em forma similar à empregada no método do disco para aeróbios. São colocadas duas fitas cada uma com um antibiótico diferente em cada placa de 9 cm de diâmetro. Em geral é necessário testar 6 antibióticos (3 placas). Os antimicrobianos com maior atividade *in vitro* e *in vivo* frente aos anaeróbios estritos são: cloranfenicol, clindamicina, cefoxitina, metronidazol, penicilina e amoxicilinanegácido clavulânico. As placas são incubadas dentro de jarra com gerador a 37 graus de temperatura. A leitura é feita após 48 horas de incubação, e a sensibilidade é interpretada nos dois métodos seguindo as tabelas publicadas pelo NCCLS.

Salientamos que existe uma boa correlação nos resultados obtidos com as duas metodologias descritas.

9. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS E LAUDOS

INTRODUÇÃO

O microbiologista ao elaborar os relatórios de exames microbiológicos deve ter em mente a possibilidade do clínico não saber interpretá-lo adequadamente, tanto por desconhecer um determinado nome de bactéria, como seu potencial patogênico e porque muitas vezes estas dúvidas associadas à disponibilidade do antibiograma possam ser um fator determinante do uso inadequado de antimicrobianos.

Cabe ao microbiologista elaborar um laudo claro e objetivo, facilitando a comunicação:

- Diretamente (telefone ou pessoalmente), indo ao encontro do clínico ou encorajando-o a procurar o laboratório para discutir casos ou participar de reuniões, visitas de enfermaria, etc.
- Elaborando manuais de coleta, informes sobre perfil de bactérias mais isoladas e padrões de sensibilidade (por exemplo em hemoculturas, em urina, ferida cirúrgica por especialidade, etc.).
- Esclarecendo novos padrões de relatórios, novos agentes, seu potencial patogênico, mudanças de padrões (p. Ex. de antibiograma), disponibilidade de recursos diagnóstico e orientação terapêutica (ex. E-test, testes rápidos com látex para pesquisa de antígenos, etc.).

Microbiologista deve ter em mente os principais agentes etiológicos correspondentes a cada material enviado, bem como da respectiva flora normal, para adequada interpretação do resultado.

Cabe ao microbiologista como membro nato da Comissão de controle de infecção hospitalar:

- Tomar iniciativa de procurar o médico ou o paciente para esclarecer dúvidas sobre exames e materiais.
- Estimular e envolver a enfermeira e o infectologista da CCIH ou clínico para a comunicação rápida dos resultados de bactérias resistentes, dos exames relacionados com diagnóstico de infecção hospitalar, dos exames de urgência como de LCR, hemocultura, etc., do diagnóstico de doenças de notificação compulsória ou que exijam isolamento, etc.

Em resumo, mais do que um retrato do crescimento nas placas de Petri, o laudo microbiológico deve ser o resultado de uma leitura interpretativa e crítica utilizado como um instrumento de comunicação e interação entre o laboratório de microbiologia e o médico.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O microbiologista na sua rotina diária para decidir a importância das bactérias ou fungos isolados deve considerar o potencial patogênico do agente, a bacterioscopia e o pedido médico.

Bactérias como *S. pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycobacterium tuberculosis*, independente do material que foram isoladas são de importância clínica e epidemiológica. Bactérias como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, se forem isolado no LCR ou sangue são de importância indiscutível, mas quando isolados em mucosas costumam representar flora e seu relato é discutível.

ALGUMAS SUGESTÕES IMPORTANTES

Como norma, não se deve identificar e fazer antibiograma de bactérias da microbiota de pele e mucosas. No entanto, é sempre conveniente entender as sugestões que se seguem como sujeitas a revisões conceituais e atualizações:

- Conversar com o médico do paciente ou com o médico da CCIH ou mesmo com o paciente se indicado.
- Quando não for possível a comunicação, relatar os achados da bacterioscopia, se realizada, com identificação sumária (bacilos ou coco-bacilos não fermentadores), ou ao nível de gênero (enterobactérias e alguns Gram positivos), se o estafilococo é *aureus* ou coagulase negativo, etc.
- Conservar a bactéria por um prazo de 7 a 10 dias deixando a possibilidade de prosseguir nos testes caso necessário.

- Estudos quantitativos são sempre que possível mais úteis que exames qualitativos, usando ou diluição do material ou semeando com alça calibrada
- Relatório quantitativo de bacterioscopia: número médio de bactérias anotadas no mínimo em 10 campos observados.
- Relatório qualitativo de bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram, descrevendo e quantificando a presença de:
 - grupos morfológicos de bactérias (cocos/bacilos/ Gram positivos ou negativos) e predomínio; quando o microbiologista for experiente recomenda-se adicionar o comentário "sugestivo de pneumococo ou *haemophilus*", etc.
 - bactérias intracelulares (neutrófilos ou fagócitos)
 - fungos leveduriformes em brotamento e hifas, etc.
- Finalmente a discussão sobre os materiais provenientes de tecido cutâneo-mucosos, o que devemos relatar com antibiograma e o que entender como flora são muito relativos, não havendo unanimidade para padrões definitivos de relatórios.

É sempre conveniente entender que as sugestões que se seguem estão sujeitas a revisões conceituais, atualizações e pequenas adaptações locais.

Como microbiologia é uma soma de evidências (microbiológicas, clínicas, epidemiológicas), torna-se impossível esgotar todas as possibilidades. O que pode e deve ser feito é buscar traçar linhas mestras para a orientação do raciocínio, deixando que cada caso seja analisado como um exercício constante do bom senso e cientificamente embasado.

Relatório quantitativo de exame microscópico pela coloração de Gram

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

LAUDO PARA O TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

OROFARINGE

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

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

Patógenos a serem relatados em isolados de cultura:

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

No caso da *Corynebacterium diphtheriae* quando solicitado, realizar ou encaminhar para Laboratório de Referência:

- Resultado sem patógenos: "Presença de bactérias da microbiota da orofaringe"
- No caso de paciente imunossuprimido, quando solicitado, cultura de vigilância e se houver predominância de bactéria ou fungo, relatar predomínio de: *P. aeruginosa*, *Candida* spp., *S. aureus*, *Enterococcus* spp., etc.; nestes casos o antibiograma será feito apenas quando solicitado pela CCIH.

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

- a bacterioscopia revelar predomínio de neutrófilos (ressalva em imunossuprimidos), presença do agente em neutrófilos/macrófagos e crescimento abundante (nítido predomínio) em relação ao restante da microbiota.
- a pedido médico, colocar a seguinte observação: "A(s) bactéria(s) isolada(s) fazem parte da microbiota da orofaringe, não sendo recomendável uso de antimicrobianos. Consultar infectologista para orientação."

SWAB NASAL

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

EPIGLOTE/NASOFARINGE

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

Relatar o resultado positivo ou negativo para *Haemophilus influenzae*, pneumococo, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Bordetella pertussis* quando pesquisados.

SEIOS DA FACE

Culturas de aspirados intra-operatórios ou obtidas por punção devem ser relatadas:

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

A rino-sinusite infecciosa aguda e não complicada na maioria das vezes é de etiologia viral. Ressaltando-se os seguintes casos:

- Em imunossuprimidos e diabéticos valorizar o achado de fungos filamentosos do tipo *Aspergillus* spp.
- Em pacientes com entubação nasotraqueal ou nasogástrica > que 48h, o material pode revelar presença de enterobactérias, bactérias não fermentadoras, *S. aureus*, leveduras e polimicrobiana.

Devem ser relatados, mas para serem valorizados deve haver clínica ou evidência radiológica e material representativo.

OUVIDO

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

▪ **Otite média:**

- Culturas de materiais obtidos por timpanocentese (miringotomia) são ideais, mas raros e devem ser relatados os achados de bacterioscopia e cultura.
- Swabs, ou aspirados de conduto auditivo em membranas previamente rompidas tem pouco ou nenhum valor diagnóstico. Sugerir não coletar este tipo de material.
- Quando realizada a cultura, havendo crescimento de bactérias da microbiota (Gram positivos, Neisserias, enterobactérias, etc.) relatar: "presença de bactérias da flora do conduto externo".
- No caso da bacterioscopia revelar predomínio de um tipo morfológico, com abundantes neutrófilos e predomínio na cultura de um agente, relatar: microscopia do esfregaço corado pelo Gram com relatório quantitativo dos elementos celulares (células, bactérias e neutrófilos) e qualitativa.
- Resultado da cultura, quando o agente isolado for *Haemophilus*, *Pneumococo* ou *M. catarrhalis*, relatar o agente isolado e o antibiograma
- Quando o agente for uma enterobactéria ou *Pseudomonas* relatar que a bactéria isolada é sugestiva de contaminação, exceto se for em paciente com entubação nasotraqueal há mais de 48h. A pedido médico fazer antibiograma.
- No caso de mastoidite a indicação é obtenção cirúrgica de fragmentos ósseos para cultivo e não cultura de secreção de ouvido externo/médio. Poderá ser relatado o cultivo deste material quando a bacterioscopia for concordante e a bactéria isolada for:
Aguda: *Haemophilus*, pneumococo, *S. pyogenes* e *S. aureus* – fazer antibiograma
Crônica: Enterobactérias, *Pseudomonas*, *S. aureus*.
- Quando isolar *Staphylococcus* coagulase negativa, *S. viridans*, Corynebactérias, etc, em flora mista, relatar: "presença de bactérias da flora do conduto auditivo externo" e não fazer antibiograma.

LAUDO PARA ESCARRO

O escarro é útil para diagnóstico de tuberculose e para os agentes de algumas micoses pulmonares (blastomicose sul-americana, histoplasmose, criptococose). Pode ser valorizado o agente isolado quando houver correspondência na bacterioscopia e quando houver poucas células epiteliais e numerosos leucócitos.

Quando a bacterioscopia revelar mais de 10 células epiteliais por campo de pequeno aumento (objetiva de 10x), havendo predomínio sobre leucócitos e sem um tipo morfológico predominante, relatar: "material com sugestiva contaminação de flora de orofaringe. Exame de valor diagnóstico prejudicado". Não processar o material e solicitar nova amostra.

Processar o material que revele menos de 10 células epiteliais, quando houver predomínio de leucócitos e predomínio de um tipo morfológico de bactéria. Este critério é mais rigoroso, pois o anterior, para mais de 25 células epiteliais, revelou ser mais fidedigno.

Os agentes bacterianos esperados em pneumonia aguda da comunidade são: *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae* e *S. aureus*.

LAUDO PARA SECREÇÃO ENDOTRAQUEAL, LAVADO TRAQUEAL, E LAVADO BRÔNQUICO

ROTINA PARA LAVADO BRÔNQUICO, ESCARRO E SECREÇÃO TRAQUEAL

- Homogeneizar muito bem a amostra, por pelo menos 1 minuto.
- Fluidificar as secreções traqueais muito espessas com 1,0 ml de solução salina estéril ou com N-acetil-cisteína.
- Pode-se também utilizar pérolas de vidro estéreis na homogeneização do material.
- Confeccionar lâmina para coloração de Gram.
- Centrifugar 7 ml e corar o sedimento, quando processar lavado brônquico.
- Corar o material direto, sem centrifugar, quando processar escarro e secreção traqueal.
- Fixar cuidadosamente o esfregaço seco sobre a chama.

- Observar ao Gram (imersão) a presença de bactérias intracelulares que devem ser reportadas caso ultrapassem 7%.
- Verificar a presença de células estratificadas epiteliais. Mais de 1 célula para cada 10 leucócitos ou mais de 10 células em campo de pequeno aumento contra indicam a realização de cultura, e portanto reportar como **Material Inadequado**.
- Confeccionar também lâminas para coloração de BAAR e pesquisa de fungos, quando necessário.
- Plaquear volume de 1 µl (alça calibrada) em meios de Mac Conkey, MN, Ágar Sangue e Ágar Chocolate (atmosfera CO₂).
- Incubar todas as placas por 24 horas a 35 + 1° C e realizar a primeira leitura quantitativa.
- Reincubar por mais 24 horas nos casos de difícil diferenciação macroscópica entre colônias.
- Multiplicar o número de cada tipo de colônia identificada pelo fator 10³.
- Interpretar como significativo as contagens > 10⁵ UFC do lavado brônquico, escarro ou secreção traqueal.
- Realizar antibiograma somente para as colônias com contagens significativas.
- Liberar apenas a identificação, sem TSA, para microrganismos em contagens inferiores a 10⁵ UFC.

RELATÓRIO

Quando usar técnica qualitativa:

- Quando o material for adequado, mas mais de três bactérias isoladas, sem predomínio, relatar microbiota mista, presença de (número) Gram positivos e (número) de Gram negativos. Não fazer antibiograma e guardar a placa por sete dias.
- Quando houver predomínio de uma bactéria relatar: predomínio do agente e antibiograma. Presença de outros microrganismos: Gram positivos e/ou Gram negativos, no máximo identificados a nível de gênero, sem antibiograma.

Quando usar técnica quantitativa:

- Se houver contagem significativa, com predomínio de um microrganismo e eventualmente 2, relatar o(s) agente(s) isolado(s) e fazer antibiograma.
- Se a contagem não for significativa ou várias bactérias da microbiota do trato respiratório superior foram isoladas relatar: "presença de bactérias da flora do trato respiratório superior sem valor diagnóstico". Não identificar nem fazer antibiograma.

LAUDO PARA LAVADO BROCOALVEOLAR OU ESCOVADO BRÔNQUICO

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

ROTINA DE SEMEADURA E INTERPRETAÇÃO PARA ESCOVADO PROTEGIDO E BAL

- Passar assepticamente a escova para um tubo contendo 1,0ml de solução salina estéril.
- Homogeneizar muito bem em vórtex por pelo menos 1 minuto.
- Confeccionar lâmina para Gram com pipetor de 10 µl ou alça calibrada de mesmo volume.
- Deixar a lâmina secar por 30 minutos dentro da estufa.
- Completar a fixação do esfregaço cuidadosamente sobre a chama.
- Confeccionar também lâminas para coloração de BAAR e pesquisa de fungos, quando necessário.
- Plaquear 10 µl (alça calibrada ou pipetor) em Mac Conkey, MN, Ágar Sangue e Ágar Chocolate (CO₂).
- Plaquear 1 µl (alça calibrada) em Mac Conkey, MN, Ágar Sangue e Ágar Chocolate (CO₂)
- Incubar todas as placas por 24 horas a 35 + 1° C e realizar a primeira leitura quantitativa.

- Reincubar por mais 24 horas nos casos de difícil diferenciação macroscópica entre colônias.
- Multiplicar a contagem dos tipos de colônias identificadas pelo fator, de acordo com o volume plaqueado.
 - Multiplicar pelo fator 10^2 quando o volume plaqueado foi 10 μ l.
 - Multiplicar pelo fator 10^3 quando o volume plaqueado foi 1 μ l.
- Quando for conhecido o valor de solução fisiológica utilizado na técnica do BAL, deve-se considerá-lo como mais um fator de correção. Por exemplo: se forem utilizados 10, 20 ou 100 ml; multiplicar por 10, 20 ou 100, respectivamente.
- Interpretar como significativo para o diagnóstico de pneumonia contagens:
 - 10^3 UFC para Escovado Brônquico Protegido
 - 10^4 UFC para BAL
- Realizar antibiograma somente para as colônias com contagens significativas.
- Liberar apenas a identificação, sem TSA, para os microrganismos em contagens inferiores à significativa.

Exemplo de cálculo:

Cultura quantitativa de BAL, colhido com 10 ml de solução fisiológica estéril, apresentou crescimento de 80 colônias de *Pseudomonas aeruginosa* com a alça de 10 μ L e 8 com a alça de 1 μ L, além de 5 colônias de *Streptococcus viridans* apenas na sementeira com 10 μ L.

Cálculo:

Pseudomonas aeruginosa –

- 10 (sol. Fisiológica) x 80 (no de colônias) x 100 (alça de 10 μ L) = 80.000 (ou $8 \cdot 10^4$ UFC/ml)
- 10 (sol. Fisiológica) x 8 (no de col.) x 1000 (alça de 1 μ L) = 80.000 (ou $8 \cdot 10^4$ UFC/ml)

Streptococcus viridans –

- 10 (sol. Fisiológica) x 5 (no de col.) x 100 (alça de 10 μ L) = 5.000 (ou $5 \cdot 10^3$ UFC/ml)

Relatar:

Pseudomonas aeruginosa - $8 \cdot 10^4$ UFC/ml / com antibiograma

Streptococcus viridans - $5 \cdot 10^3$ UFC/ml / sem antibiograma

RELATÓRIO DA BACTERIOSCOPIA

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

Relatar:

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

RELATÓRIO DA CULTURA

Culturas quantitativas de amostras do trato respiratório inferior, relatar:

- Contagem final do(s) microrganismo(s) isolado(s)
- Quando isolar um ou até dois microrganismos em contagens significativas (vide parâmetros), fazer antibiograma
- Comentar: contagem bacteriana significativa – bom valor preditivo de infecção se a clínica for concordante.

Quando as contagens não forem significativas ou mais de dois microrganismos isolados e bacterioscopia com predomínio de células epiteliais sobre os leucócitos, relatar: "Presença de bactérias do trato respiratório superior" - sem valor diagnóstico.

Contagens bacterianas consideradas significativas

Escarro, aspirado endotraqueal, lavado brônquico	=	10 ⁵ - 10 ⁶ Ufc/ml
Escovado brônquico protegido	=	10 ³ Ufc/ml
Lavado broncoalveolar (BAL)	=	10 ⁴ Ufc/ml

CANDIDA EM SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS

A Pneumonia causada por *Candida* spp. é considerada uma raridade e o diagnóstico só pode ser definido por biópsia pulmonar que revele invasão tecidual e não por cultura. É muito freqüente a presença qualitativa de *Candida* spp. em todos os materiais obtidos de pacientes com cânula oro-traqueal ou traqueostomia.

O relato de isolamento de *Candida* costuma induzir a terapêutica desnecessária, com custo elevado, com efeitos colaterais e seleção de cepas resistentes. Mesmo contagens significativas de leveduras devem ser consideradas com cautela, pois pode apenas representar colonização. Exceção deve ser feita aos recém-natos pré-termo e de baixo peso. Nestes, a mortalidade por candida apresenta níveis bastante elevados e a possibilidade de infecção invasiva deve ser considerada. Outros fungos como *Histoplasma*, *Cryptococcus* spp. e mesmo *Aspergillus* spp. (particularmente em imunossuprimidos) devem ser identificados e relatados.

LAUDO PARA PLEURAL

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

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

LAUDO PARA ABSCESSO PULMONAR

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

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

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

LAUDO PARA OCULAR

- Os potenciais patógenos devem ser distinguidos dos potenciais contaminantes de mucosas, sendo o recurso mais simples a bacterioscopia do material, quando necessário concentrado fazendo-se

uma suspensão do swab em salina e centrifugado em cito-centrífuga. No entanto é comum a bacterioscopia ser inconclusiva, tanto pela dificuldade de caracterizar a bactéria como pelas outras etiologias (viral, *Chlamydia trachomatis*, alérgica, química, uso prévio de colírios com antibióticos, etc.).

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

LAUDO PARA LÍQUIDO CÉFALO RAQUIDIANO (LCR)

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

LAUDO PARA FEZES

- Os potenciais agentes de diarreia são muitos.
- laboratório deve listar apenas os agentes pesquisados na sua rotina ou quando especificado pelo clínico relatar o resultado sobre os agentes solicitados.
- Relatar: “Cultura negativa para os seguintes enteropatógenos pesquisados: *E. coli* clássica, *E. coli* invasora, *E. coli* O 147 EHEC, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp. (opcional), *Plesiomonas shigelloides* (opcional).

- Relatar pesquisa de leucócitos quando realizada pois dá suporte a infecções por *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*.
- No caso de realizar cultura para *Campylobacter* de rotina, incluí-lo no relatório. Lembrar que diarreia/enterocolite em pacientes com mais de 3 dias de hospitalização e fazendo uso de antimicrobianos pode ser *Clostridium difficile*, devendo pesquisar a toxina com kits específicos.
- Diarreia com mais de 7 dias de duração em imunocomprometidos pode ser por parasitas (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora belli* e em paciente com HIV, complexo do *Mycobacterium avium*).

LAUDO PARA PELE, ABSCESSOS E FERIDAS

- Abscesso tecido subcutâneo
- Abscesso cerebral
- Abscesso intranegabdominal

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

- Os abscessos fechado e puncionados com técnica asséptica são considerados materiais de bom valor preditivo diagnóstico quando revelam bactérias ou fungos.
- Deve-se, portanto, orientar o médico para obter material nas melhores condições de assepsia possível.
- Encaminhar rapidamente o material para o laboratório.
- Para abscessos considerar a possível participação de anaeróbios estritos ou microaerófilos. Quando disponível fornecer meio de transporte adequado ou orientar para enviar o material na seringa sem agulha.
- Fazer lâmina para bacterioscopia, e, se indicado, exame direto com KOH 10% para pesquisa de fungos, assim como pesquisa de BAAR para micobactérias.
- Nos abscessos de tecido subcutâneo e cerebral a bacterioscopia pode dar orientação útil para escolha dos meios de semeadura ou ajudar no resultado. *S. aureus* é a causa mais importante em abscesso subcutâneo, mas em caso de associação com mordida, os fastidiosos devem ser lembrados.
- No caso de abscesso cerebral, o diagnóstico correto e rápido é de extrema valia. O exame microscópico pode ser muito útil se revelar algum agente. Pode haver participação dos mais variados agentes como bactérias comuns, fastidiosos, fungos, nocardia, micobactérias, etc. Deve-se procurar semear no maior número de meios diferentes, inclusive em caldo tioglicolato.
- No caso de abscesso abdominal a associação de enterobactérias com anaeróbios é esperada. Dependendo da história clínica lembrar de *Salmonella* e *Yersinia*.
- No caso de abscesso de tecido subcutâneo o resultado ideal é quando concordante com a bacterioscopia e revelando agente potencialmente patogênico. O *S. aureus* e *Streptococcus* beta hemolíticos causam mais celulite, mas podem ser isolados em abscessos, sendo as enterobactérias raras.
- No caso da cultura revelar bactérias da microbiota, mas concordante com a bacterioscopia (*S. viridans*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Coryneformes*, etc.); liberar o resultado com o antibiograma.
- No caso de bacterioscopia negativa ou discordante e, principalmente em abscesso drenando há alguns dias, liberar o resultado fazendo restrições sobre a possibilidade de contaminação; a bactéria isolada possivelmente representa contaminação pela microbiota da pele, assim, guardar a bactéria por sete dias e não fazer o antibiograma.
- No caso de abscesso cerebral se o exame microscópico revelar possível agente, o clínico deve ser imediatamente comunicado e informado do andamento dos exames de cultura.
- Tanto bactérias potencialmente patogênicas como possíveis contaminantes de pele ou mucosas podem ser isoladas, mas o clínico deve estar informado e o teste de sensibilidade poderá ser feito de qualquer destas bactérias.

- Os abscessos abdominais polimicrobianos da comunidade em geral respondem à terapêutica empírica e não exigem a identificação de todas as bactérias aneróbias facultativas e anaeróbias estritas. Importante relatar quando isolar enterococcus ou enteropatógenos ou bactérias não comuns ou nos casos de insucesso terapêutico; indica-se identificar os agentes isolados e fazer o antibiograma.

FERIDA / LESÃO CUTÂNEA

Em geral estes materiais são feridas de origem na comunidade. O relatório de cultura de ferida aberta ou lesão depende muito de saber se a coleta foi adequada removendo secreções superficiais ou não. Relatar quando isolar *S. pyogenes*, *S. aureus* e fastidiosos em condições clínicas concordantes (mordida, acidente com água, terra, etc).

- Enterobactérias e *Pseudomonas* podem ser contaminantes ou patogênicos. Deve-se relatar o achado, mas colocar como ressalva a possibilidade de contaminação.
- *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus* coagulase negativo, Coryneformes, etc., sugerem contaminação

Dá respaldo a possibilidade de isolamento de agente patogênico quando são atendidos os seguintes requisitos:

- Coleta bem feita.
- Bacterioscopia concordante com a cultura e
- Ocorrem muitas colônias de uma mesma bactéria, isoladas em cultura pura ou em nítido predomínio.

FERIDA CIRÚRGICA

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

Neste caso infecções polimicrobianas são comuns, devendo-se considerar os gêneros predominantes. Deve-se guardar as cepas isoladas por período maior (mínimo 30 dias) para eventual investigação de surto e fazer antibiograma com atenção para pesquisa de bactérias multiresistentes.

DRENO / FÍSTULA

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

Nos casos em que a bactéria encontrada já tenha sido isolada de procedimento com menor risco de contaminação (biópsia, punção, etc.) e persiste, relatar o achado e fazer antibiograma. Para os demais casos relatar os gêneros que predominaram na cultura, sem antibiograma e que representam possível contaminação. Guardar as bactérias por sete dias. Considerar que fístulas espontâneas podem revelar presença de micobacteriose, micoses, actinomicose, etc.

BIÓPSIA

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

Condições que dão segurança para liberação do resultado e antibiograma:

- Condições adequadas de coleta, transporte e processamento preliminar.
- Bacterioscopia concordante com achados de cultura.
- Cultura pura ou predomínio de algum germe em particular.
- Contagens >10⁴ UFC/g tecido

Para os demais casos:

- Bacterioscopia negativa ou discordante

- Culturas polimicrobianas
- Isolamento de bactérias da flora cutâneo-mucosa (*Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, corineformes, *Neisseria* spp., etc)
- Baixas contagens < 10⁴ UFC/g de tecido; relatar o(s) agente(s) isolado(s), sua contagem sem antibiograma e guardar a(s) bactéria(s) por sete dias.

GÂNGLIO

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

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

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

Contactar o clínico e o patologista, e se persistir a suspeita de etiologia bacteriana, quando possível, solicitar nova amostra.

LAUDO PARA GENITAL

URETRAL

Os principais agentes etiológicos das uretrites estão bem estabelecidos:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ▪ <i>Chlamydia trachomatis</i> ▪ <i>Mycoplasma</i> spp. ▪ <i>Ureaplasma</i> spp. ▪ <i>Herpes simplex</i> (vírus) | <p>Mais raramente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Trichomonas vaginalis</i> ▪ <i>Haemophilus</i> spp. ▪ outros |
|---|--|

Colher sempre lâmina para bacterioscopia:

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

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

Quando isolar *Staphylococcus* coagulase negativo ou outras bactérias da flora genital relatar: "Presença de bactérias da flora genital", não fazer antibiograma. Sugerir, quando não realizado, a pesquisa de *Chlamydia* e *Micoplasma*.

Quando isolar enterobactérias, *Enterococcus* em cultura pura ou em grande quantidade e for concordante com a bacterioscopia, relatar o isolamento com antibiograma e concluir: "Bactéria raramente isolada como agente de uretrite; sugerimos investigar outras causas como *Chlamydia*, *Micoplasmas*, *Trichomonas* etc."

VAGINAL

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

A bacterioscopia é sempre útil para observar:

- presença de leveduras
- presença e quantidade de neutrófilos
- presença e predomínio de bactérias
- presença de *Gardnerella* spp. e *Mobiluncus* spp., e outros anaeróbios que caracterizam a vaginose, associados às "clue cells" (células características do epitélio vaginal abarrotadas de bactérias).

A bacterioscopia também é útil:

- Quando isolar *Candida* spp. e for caso de doença recidivante é interessante (quando disponível) a identificação de espécie, podendo ser necessário também o teste de sensibilidade (mais fidedigno e prático)
- Quando isolar *Streptococcus* beta hemolítico do grupo A, *Streptococcus agalactiae*, enterococos, *Listeria* spp.

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

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

ENDOCERVICAL

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

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

No caso de material endometrial e amniótico, fazer cultura para anaeróbios e bacterioscopia. No caso de não realizar cultura para anaeróbios, relatar a bacterioscopia e o resultado da cultura. Destacar a possibilidade de anaeróbios se visualizar bactérias no Gram sem correspondente crescimento.

ESPERMA E/OU FLUÍDO PROSTÁTICO

É aconselhável para elaborar um laudo adequado :

- Fazer bacterioscopia do esperma e da secreção prostática
- Verificar contagem de leucócitos
- Semear com alça calibrada de 10 µL e fazer contagem de colônias
- Relatar os achados de bacterioscopia, contagem de leucócitos e bactéria isolada em contagens = 10³ Ufc/ml. No caso de enterobactérias, enterococos e *Pseudomonas* fazer antibiograma.

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

LAUDO PARA URINA

Para a interpretação da urocultura, algumas informações são consideradas úteis:

- Se o paciente apresenta sintomas de infecção urinária, Leucocitúria
- Gestante, Idade/sexo
- Tipo de coleta: jato médio, coletor, punção de sonda vesical em sistema fechado, punção supranegpública, etc.
- Uso prévio de antibióticos à coleta da presente amostra, etc.

URINAS COLETADAS POR JATO MÉDIO

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

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

Um provável patógeno	<ul style="list-style-type: none"> Definitivamente identificar ao nível de espécie e realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
Um provável contaminante	<ul style="list-style-type: none"> No caso de paciente assintomático solicitar nova amostra, pois se trata de provável bacteriúria assintomática.
(difteróides, <i>S. viridans</i> , lactobacilos, estafilococos coagulase negativa e outros que não sejam <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .)	<ul style="list-style-type: none"> No caso da presença de outras espécies em contagens $< 10^4$ UFC/ml, relatar número de microrganismo(s) presente. Realizar uma identificação limitada: por exemplo distinguir entre <i>S. saprophyticus</i> de outros estafilococos coagulase negativa, ou <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B) de <i>Streptococcus viridans</i>. Não fazer antibiograma e sugerir nova coleta. É raro, mas não impossível, ocorrer infecção urinária por bactérias da microbiota da uretra ou vagina. Para caracterizar ITU há necessidade de confirmar o achado com nova urocultura, e que esteja associada a sintomas. Sintomas e leucocitúria podem tornar muito provável o diagnóstico. Sem sintomas pode ser bacteriúria assintomática ou falha grosseira na coleta. Enumerar outras espécies eventualmente presentes em $< 10^4$ UFC/ml.
Dois prováveis patógenos (com um diagnóstico de infecção do trato urinário crônica ou recorrente)	<ul style="list-style-type: none"> Definitivamente identificar ao nível de espécie. Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
Dois prováveis patógenos (com sintomas de ITU)	<ul style="list-style-type: none"> Identificar ao nível de espécie. Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma). Solicitar nova amostra para confirmação.
Mais que dois microrganismos	Reportar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."

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

Um provável patógeno	<ul style="list-style-type: none"> Para pacientes sob antibioticoterapia, grávidas, recém-nascidos, com infecção urinária de repetição, realizar identificação e teste de sensibilidade. Um potencial patógeno presente em $> 10^2$ UFC/ml em mulheres sintomáticas e $> 10^3$ UFC/ml em homens sintomáticos, fazer identificação e antibiograma.
Um provável contaminante	<ul style="list-style-type: none"> Leucócitos normais: descritivamente identifique o isolado. Leucócitos aumentados: solicite nova amostra.
Mais que dois microrganismos	Relatar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."
Sem informação clínica	<ul style="list-style-type: none"> Descreva o microrganismo presente entre 10^4 e 10^5 UFC/ml, com base na morfologia. Entre em contato com o paciente e/ou médico. Solicite informações e/ou a coleta de nova amostra. Caso o contato não seja possível, mantenha a cultura a temperatura ambiente por 3 dias para possível retomada de identificação, se requerido pelo médico do paciente.

URINAS COLETADAS POR CATETERIZAÇÃO

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

Dois ou mais prováveis patógenos	<ul style="list-style-type: none">Realize a identificação e teste de sensibilidade de ambos os isolados.Descritivamente identifique as espécies presentes em $< 10^4$ UFC/ml.
Um ou dois prováveis contaminantes	<ul style="list-style-type: none">Reportar o(s) microrganismo(s) presente(s) com descrição do tipo(s) morfológico(s), exemplo, difteróides, <i>Streptococcus</i> do grupo viridans.Reportar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."
Um provável patógeno e um provável contaminante	<ul style="list-style-type: none">Identificar o provável patógeno e fazer antibiograma.Fornecer o tipo morfológico do provável contaminante.
Três ou mais microrganismos	<ul style="list-style-type: none">Fornecer uma descrição dos tipos morfológicos.Reportar: "Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura."

Contagem de colônias $< 10^4$ UFC/ml:

- Para pacientes sob antibioticoterapia, mulheres sintomáticas, homens sintomáticos, realizar identificação e teste de sensibilidade.
- Para todos os outros pacientes, forneça uma descrição do(s) tipo(s) morfológico(s) presente(s) e requeira nova amostra.
- Mantenha a cultura a temperatura ambiente por 3 dias para se necessário retomar o processamento de identificação se requerido pelo médico do paciente.

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

URINAS COLETADAS POR PUNÇÃO SUPRAPÚBICA

Um ou dois patógenos presentes	<ul style="list-style-type: none">Identifique ao nível de espécie.Realize o teste de sensibilidade do provável agente patogênico.
Três ou mais patógenos presentes	<ul style="list-style-type: none">Identifique.Mantenha a cultura por três dias para possível consulta.Examine em até 48 horas de incubação.
Sem crescimento	<ul style="list-style-type: none">Reporte "Sem crescimento, teste com sensibilidade de $> 10^2$ UFC/ml em 48 h" - (para semeadura de 10μl).

OBSERVAÇÕES

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

LAUDO PARA SANGUE

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

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

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

Hemoculturas positivas e repetidas para bactérias potencialmente contaminantes podem ser consideradas patogênicas quando afastada a contaminação por cateter. Considerar a hipótese de endocardite. Quando houver suspeita de fastidiosos ou fungos ou micobactérias conservar as hemoculturas por 30 a 40 dias.

Relação entre idade e volume ideal de sangue a ser coletado

Idade	volume
< 1 mês	1-2 ml
1 mês a 2 anos	2-3 ml
> 2 anos a 10 anos	3-5 ml
Adolescente	10-20 ml
Adulto	40 ml

PONTA DE CATETER

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

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barenfanger, J. **Improving the clinical utility of microbiology data: an update.** Clin Microbiol Newsl, 25(1): 1-8, 2003.
2. Baron, E.J. and Tenover, S.M. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology.** 8th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1990.
3. Laffeneur, K., Janssens, M., Charlier, J., Avesani, V., Wauters, G., and Delmée, M. **Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods.** J Clin Microbiol, 40(3):1085-1087, 2002.
4. Christensen, W.B. **Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types.** J Bacteriol, 52:461-466, 1946.
5. Eschenbach, D.A., Pollock, H.M. and Schachter, J. **Laboratory diagnosis of female genital tract infection.** CUMITECH. Coord. Ed. S.J. Rubin, ASM, Washington, DC, 1983.
6. Evangelista, E.T. and Beilstein, H.R. **Laboratory diagnosis of gonorrhoea.** CUMITECH. Coord. Ed. C. Abramson. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993.
7. Balows A., Hausler, W.J. Jr., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. **Manual of clinical microbiology.** 5th Ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991.
8. Forbes, B.A., Sahm, D.S. and Weissfeld, A.S. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology.** 10th Ed., CV Mosby, St. Louis, 1998.
9. Isenberg, H.D. **Clinical microbiology procedures.** ASM Microbiology, Washington, DC, 1992.
10. Isenberg, H.D. **Essential procedures for clinical microbiology,** American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998.
11. Koneman, E.W., Allen, D.S., Janda, M.W., Schreckenberger C.P. and Winn Jr., C.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology,** 5th ed., Lippincot, Philadelphia, 1997.
12. Mayhall, C.G. **Hospital epidemiology and infection Control.** Williams & Williams, 1996.
13. Mc Faddin, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
14. Mc Neil, M.M. and Brown, J.M. **Actinomycetes: epidemiology and microbiology.** Clin Microbiol Rev, 7(3): 357-417, 1994.
15. Murray, P.R., Baron, J.E., Pfaller, A.M., Tenover, C.F. and Tenover, H.R. **Manual of clinical microbiology.** American Society for Microbiology, 7th ed., Washington. DC, 1999.
16. NCCLS. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria.** Approved standard, v.17, no. 2, National Committee for Clinical Laboratories Standards, Villanova, 1997.
17. Oplustil, C.P., Zoccoli, C.M., Tobouti, N.R., e Sinto, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica,** Sarvier, São Paulo, 2000.
18. Rhoden, R.A. and Hermann, G.J. **Isolation and identification of *Enterobacteriaceae* in the clinical laboratory.** U.S, DHEW, Center for Disease Control, Atlanta, 1974.
19. Sack, R.B., Tilton, R.C. and Weisfeld, A.S. **Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea.** CUMITECH 12, Coord. Ed. S.J. Rubin, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1980.
20. Schreckenberger, P.C. **Questioning dogmas: proposed new rules and guidelines for the clinical microbiology laboratory.** American Society for Microbiology News, 67: 388-89, 2001.
21. Schrenkenberger, P.C. **Practical approach to the identification of glucose nonfermenting Gram-negative bacilli: a guide to identification.** 2nd. Ed., University of Illinois, College of Medicine at Chicago, CACMLE, 1996.
22. Thayer, J.D. and Martin Jr., J.E. **A seletive medium for the cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*.** Public Health Rep, 79:49-57, 1964.
23. Toledo. M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. **EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase.** Rev Microbiol, 13(04): 309-315, 1982.
24. Toledo. M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. **MILi: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase.** Rev Microbiol, 13(04):230-235, 1982.