

**MANUAL DE PROCEDIMENTOS BÁSICOS EM
MICROBIOLOGIA
CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR**

MÓDULO 3

**PROCESSAMENTO DE MATERIAL CLÍNICO
IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

1. Introdução
2. Estafilococos, Streptococos, Enterococos e outros Gram positivos
3. Neisserias
4. Enterobactérias
5. Bactérias Não Fermentadoras
6. Bacilos Curvos ou Espiralados
7. Bacilos Gram positivos
8. Fastidiosos
9. Anaeróbios
10. Interpretação de Resultados e Relatórios

Autores

- Introdução
- Enterobactérias
- Fastidiosos, Espirilados, Aeromonas e Vibrio
- Bacilos Gram positivos
- Interpretação e Relatórios

Dr. Carlos Emilio Levy

- Centro Infantil Dr. Domingos Boldrini - Campinas SP

- Estafilococos e Estreptococos

Dra. Angela von Nowakonski

- Serviço de Microbiologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP

- Não fermentadores

Dr Carlos Emilio Levy e Dr Igor Mimica

- Anaeróbios

Dr. Igor Mimica e Dra.Lycia Mimica

- Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo SP

Revisores:

Dr. Lauro Santos Filho

- Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB

Dr. Emerson Danguy Cavassin

- Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da UE Londrina PR.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO À ROTINA DE LABORATÓRIO

1. Introdução
2. Esquemas de Identificação: Meios de cultura
3. Microscopia: Técnica para preparo do esfregaço
4. Semeadura em Meios de Cultura
5. Incubação
6. Avaliação do crescimento e Contagem
7. Identificação
8. Esquema geral de identificação bacteriana

Capítulo 2

ESTAFILOCOCOS, ESTREPTOCOCOS, ENTEROCOCOS E OUTROS COCOS GRAM POSITIVO

1. Introdução
2. Identificação preliminar
3. Identificação de estafilococos
4. Identificação de estreptococos

Capítulo 3

NEISSERIAS

1. Introdução
2. Isolamento
3. Transporte e semeadura do material
4. Bacterioscopia e identificação

Capítulo 4

ENTEROBACTÉRIAS

1. Introdução
2. Tipos de Testes Utilizados
3. Etapas da Identificação de Enterobactérias
4. Identificação da Enterobactérias de importância Clínica
5. Identificação Sorológica

Capítulo 5

BASTONETES NÃO FERMENTADORES

1. Introdução e provas de identificação
2. Procedimentos para a identificação
3. Tabelas de Identificação dos Bactérias não fermentadoras
4. Tabela Geral de Consulta para identificação de Bactérias não fermentadoras
5. Referências bibliográficas

Capítulo 6

BACILOS CURVOS OU ESPIRALADOS

1. Introdução
2. Campylobacter
3. Vibrios, Aeromonas e Plesiomonas
4. Referências bibliográficas

Capítulo 7

BACILOS GRAM POSITIVO

1. Introdução
2. Orientação geral para identificação de bacilos Gram positivo
3. Corineformes
4. Listeria, Erisipelotrix e Kurthia
5. Bacilos esporulados
6. Actinomicetos
7. Referências bibliográficas

Capítulo 8

FASTIDIOSOS

1. Características gerais
2. Bartonella
3. Bordetella
4. Brucella
5. Francisella

6. Haemophilus
7. Legionella
8. Pasteurella
9. Actinobacillus
10. Capnocytophaga
11. Eikenella
12. Kingella
13. Cardiobacterium hominis
14. Chromobacterium violaceum
15. Streptobacillus moniliformis

Capítulo 9

BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS

1. Introdução
2. Fatores predisponentes
3. Processamento dos materiais, identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos
4. Referências

Capítulo 10

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS E RELATÓRIOS

1. Introdução
2. Relatórios microbiológicos
3. Análise microbiológica
4. Sugestões de relatórios por material
5. Referências

Abreviaturas:

AS = ágar sangue

AC = ágar chocolate

BAL=lavado bronquio-alveolar

BHI = Brain Heart Infusion (infusão cerebro-coração)

CLED = ágar CLED

CTA = Cystine Trypticase agar

DNase = prova da Desoxi-ribonuclease

EIA = imunoenensaio enzimático

ELISA = teste de imunoabsorção ligado a enzima

H₂S = ácido sulfídrico

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio (água oxigenada)

LCR = líquido cefaloraquidiano ou líquido

LJ = ágar Lowenstein Jensen

MC = ágar MacConkey

mL = mililitro

MYC = Mycosel

NYC= meio New York City

ONPG =o-nitrofenil-beta -D-galactopyranosideo

PCR = reação de polimerase em cadeia

PYR = pyrrolidonil aminopeptidase

rpm = rotações por minuto

SAB = ágar Sabouraud

SS = ágar Salmonella Shigella

SPS = Polietanol sulfonato de sódio

TIO = caldo tioglicolato

TMM = ágar Thayer Martin modificado

TSB = tripticase Soy Broth (caldo tripticase soja)

UFC= unidades formadoras de colônia

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO À ROTINA DE LABORATÓRIO

1. INTRODUÇÃO:

O objetivo deste fascículo é dar orientações sobre procedimentos da rotina microbiológica a partir da chegada do material à bancada até a identificação dos principais microrganismos de importância clínica.

1.1. O Módulo 3 compreende:

- Esquema prático de seleção de meios mais empregados na semeadura para isolamento de microrganismos de rotina.
- Leitura dos materiais semeados com base nas características das colônias, bacterioscopia e principais agentes esperados.
- Esquema geral de identificação.
- Identificação dos gêneros e espécies de bactérias de importância clínica.

1.2. O microbiologista ou responsável pela rotina deverá conferir as requisições ou pedidos de exame de cada material e a respectiva amostra para:

- Verificar a existência de pedido e amostra apropriadamente identificados.
- Tipos de exames solicitados.
- Se a quantidade de material é suficiente.
- Aspecto da amostra - purulento, límpido, hemorrágico, etc.

2. ESQUEMAS DE IDENTIFICAÇÃO: Meios de Cultura

2.1. Cultura para fungos ou micobactérias

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

2.2. Coprocultura - recomendava-se semear em caldo enriquecedor do tipo Selenito, Tetracionato, etc., que têm valor duvidoso, sendo indicado atualmente para pesquisa de portadores.

2.3. Escarro para tuberculose - deve ser conservado em geladeira ou tratado para descontaminação, antes de semear em Lowenstein Jensen.

**Tabela 1 - Meios de cultura para semeadura dos principais materiais clínicos
Indicação de exames microscópicos**

MATERIAL	MEIOS DE CULTURA								Lâmina
	AC	AS	MC	TIO	OUTRO	L J	SAB	MYC	
Abscesso profundo		X	X	X					uma
Ferida cutânea/cirúrgica		X	X			2.1	2.1	2.1	uma
Abscesso cerebral	X	X	X	X		2.1	2.1	2.1	duas
Abscesso pulmonar	X	X	X	X					duas
Biópsia – 2.10	X	X		X					duas
Coprocultura (fezes) – 2.2			X		SS				não
Líquido de Diálise – 2.11	X	X	X						uma
Endométrio/ Amniótico	X	X		X					uma
Escarro piogênicos		X	X						duas
Escarro para Tuberculose – 2.3						X			uma
Esperma/ Prostático		X	X						uma
Fístula/ Dreno		X	X						não
Gânglio – 2.10	X	X		X		2.1	2.1	2.1	duas
Lavado Brônquico (BAL) – 2.4	X		X			2.1	2.1	2.1	uma
Líquor (LCR) – 2.5	X	X				2.1	2.1	2.1	duas
Nasal/ Orofaringe		X	X						não
Osso (Biópsia–2.10 / Aspirado)		X	X	X					uma
Ocular	X	X	X						duas
Orofaringe		X	X						uma
Ouvido	X	X	X						uma
Peritonal/ Ascítico	X	X	X	X					uma
Pleural	X		X	X		2.1			duas
Ponta de cateter – 2.6		X							não
Sangue/ Hemocultura – 2.7	X	X							uma
Uretral – 2.9	X	X			TM				uma
Urina – 2.8					CLED				uma
Vaginal/ Endocervical – 2.9	X	X	X		TM				uma

Legenda: AS= ágar sangue

AC= ágar chocolate

CLED = ágar CLED

MC = ágar Mc Conkey

MYC = Mycosel

BAL =lavado bronco-alveolar (LBA)

LJ = ágar Lowenstein Jensen

TIO = caldo tioglicolato

TM = ágar Thayer Martin (opcional)

SAB = ágar Sabouraud

SS = ágar *Salmonella Shigella*

2.4. Lavado brônquico:

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

2.5. Líquido Céfal Raquidiano (LCR):

- Centrifugar por 10 minutos/ 2.000 RPM, quando purulento, semear sem centrifugar.
- Semear em AC + AS + TIO
- Quando solicitado, pesquisar *Criptococos*, usando coloração com Tinta da China.

2.6. Ponta de cateter:

- 5 cm da ponta do cateter deve ser rolada 5 vezes sobre a placa de AS, utilizando a técnica semi-quantitativa de Maki.
- Quando enviado pedaço maior de cateter pode-se injetar 1 mL de salina cultivar separadamente (lúmen). A superfície externa pode ser semeada pela técnica de Maki

2.7. Hemoculturas positivas:

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

2.8. Urina:

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

2.9. Secreção vaginal, endocervical, uretral e urina:

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 2 - Escolha de Meios de Cultura Seletivos em Relação ao Agente

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

3. MICROSCOPIA - Técnica para preparo do esfregaço:

- Utilizar lâmina nova e limpa.
- Identificar a lâmina de maneira segura.
- Rolar toda a superfície do swab sobre a lâmina para não destruir as células.
- Procurar não fazer esfregaço espesso e nem muito delgado.
- Fixar rapidamente na chama.
- Quando material escasso, demarcar a área do esfregaço
- Proceder o método de coloração mais apropriado.

4. SEMEADURA EM MEIOS DE CULTURA:

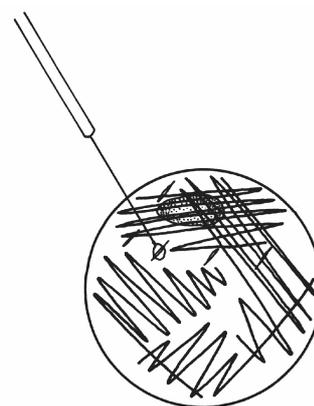
4.1. Semeadura inicial - qualitativa

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

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

Fig 1

- Descarregar o material num canto da placa,
- Flambar a alça
- Esfriar a alça em um canto do ágar
- Semear partindo da ponta da primeira semeadura



- A cada mudança de direção flambar a alça e esfriá-la.

4.2. Semeadura Quantitativa - Materiais indicados ou recomendados

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

4.2.1. Técnica de Semeadura Quantitativa –

O cultivo quantitativo baseia-se na semeadura de um volume conhecido de material e a contagem do número de ufc obtidas após incubação.

Utilizam-se dois artifícios para o efeito de diluição do material:

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

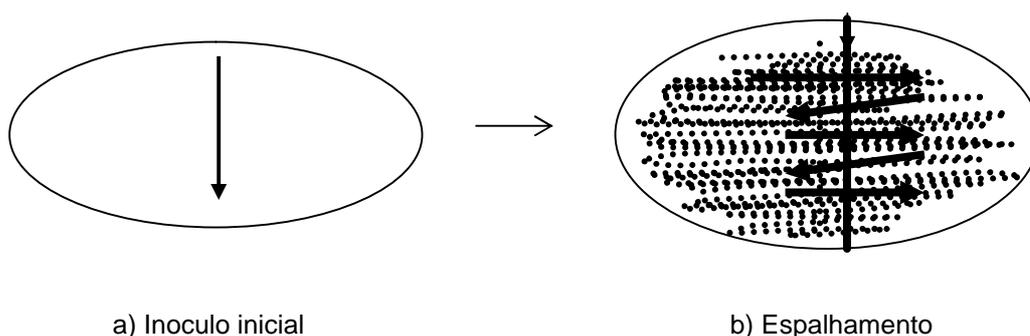
Procedimentos gerais

- homogeneizar o material com agitação manual em diferentes direções ou em vortex (mixer)
- obter o volume definido pela técnica com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada. No caso da alça, observar a integridade da película formada até deposita-la na parte superior da placa. Ainda com a alça, sem flambar até o final da semeadura, distribuir o material em linha reta até a outra extremidade. Perpendicularmente, distribuir o material por toda a superfície de

maneira uniforme. Repetir o mesmo procedimento por 3 vezes, ou até que a superfície da placa esteja seca, alterando a direção da estria (Figura 2)

- evitar o uso de placas úmidas e, após semeada, não incubar caso haja umidade na superfície do agar
- evitar o rompimento do agar, estriando o material suavemente
- uma suspensão com 10^5 ufc/mL deve resultar em um tapete de colônias que cubra toda a superfície do agar de maneira uniforme, com colônias confluentes

Figura 1



5. INCUBAÇÃO - a incubação deve seguir alguns parâmetros determinados.

5.1. Atmosfera

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

- Para bactérias anaeróbias, incubar em sistema de anaerobiose estrita (vide capítulo específico).

5.2. Temperatura

- 36°C +/- 1°C é a temperatura para a grande maioria das bactérias da rotina, incluindo os anaeróbios e micobactérias.
- Fungos podem ser cultivados a 30°C ou 25 e 35°C (vide fascículo específico)
- 42°C pode ser necessário para isolar espécies de *Campylobacter*, *Acinetobacter baumannii*, e algumas espécies de *Pseudomonas*.

5.3. Umidade

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

5.4. Tempo

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

5.5. Leitura – alguns aspectos são fundamentais na leitura inicial das placas para se estabelecer um diagnóstico presuntivo e direcionar o exame.

Características macroscópicas das colônias

5.5.1 Tamanho

- O tamanho das colônias deverá ser considerado na placa como um todo, uma mesma cepa pode formar colônias de tamanhos variados em diferentes pontos da placa
- Puntiforme (≤ 1 mm de diâmetro) - colônias muito pequenas, características de bactérias mais exigentes
- Pequena (até 2 mm de diâmetro) – *Shigella* e *Yersinia* costumam crescer em MC e SS como colônias pequenas e lactose negativa. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., pneumococos, *Streptococcus* spp. *Cândida* spp. e alguns

esfafilococos coagulase negativo também costumam formar colônias pequenas

- Média (até 3 mm de diâmetro) – Enterobactérias, não fermentadores e Estafilococos
- Grandes (mais de 4 mm de diâmetro) – *Bacillus* spp., algumas enterobactérias como *Klebsiella* e *Enterobacter*, o mesmo ocorre com não fermentadores como *Pseudomonas*. Vale lembrar a formação de véu, característico do gênero *Proteus*, *Comamonas* e algumas cepas de *Pseudomonas*.

5.5.2 Cor

- A coloração dependerá do meio de cultura utilizado
 - Meios não diferenciais – pode-se identificar a coloração características de alguns microrganismos:
 - *S. aureus* – amarelo
 - *Micrococcus* – amarelo
 - *Serratia* – avermelhado
 - *Roseomonas* - róseo
 - *Pseudomonas* – diferentes tons de verde e castanho
 - *Enterococcus casseliflavus* – amarelo
 - Meios diferenciais – a coloração da colônia sofre interferência das reações que ocorrem com substratos dos meios de cultura
 - Utilização da lactose no MC – vermelho
 - Utilização da lactose no CLEC – amarelo
 - Utilização do manitol em agar manitol salgado – amarelo
 - Produção de H₂S no HE e SS - negro

5.5.3 Hemólise

- Baseada na lise de hemácias contidas no agar sangue (5%)
 - Lise total – denominada β-hemólise, ocorre a formação de halo de transparência ao redor e/ou sob a colônia: S.

pyogenes, *S. agalactiae*, *Listeria*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus* ...

- Lise parcial – denominada α -hemólise, há formação de halo com coloração esverdeada: *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus*.
- Ausência de lise – definida como γ -hemólise, meio de cultura inalterado: *Enterococcus*, Estafilococos coagulase negativo ...

5.5.4 Forma da colônia

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

5.5.5 Consistência

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

5.5.6 Densidade

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

5.5.7 Cheiro

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

6. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E CONTAGEM

6.1. Cultura Quantitativa

- Avaliar a homogeneidade de crescimento pela placa
- Contar separadamente todas as colônias diferentes, até 300 ufc
- Para a contagem deve-se marcar com uma caneta o verso de cada unidade contada, para evitar que se conte duas vezes a mesma colônia
- Contagens maiores devem ser determinadas por estimativa
 - Dividir a placa em 4 ou 8 partes
 - Observar a homogeneidade do crescimento e contar as partes que sejam mais representativas do crescimento total
 - Contar o número de ufc da parte escolhida e multiplicar pelo total de partes
- Converter o número de ufc contadas em ufc/mL ou ufc/g, conforme o material analisado
- Utilizar o fator de correção
 - do volume:
 - 1 μ L – multiplicar por 1.000
 - 10 μ L – multiplicar por 100
 - 100 μ L – multiplicar por 10
 - e/ou diluição utilizados:
 - diluição 1:10 – multiplicar por 10
 - diluição 1:100 – multiplicar por 100
 - diluição 1:1000 – multiplicar por 1000

6.2. Cultura Semi-quantitativa e Qualitativa

Para a maioria das culturas não se padroniza o volume do inóculo e semeia-se o swab e/ou com a alça, com a finalidade apenas de obter colônias isoladas para posterior identificação (secreções cutâneo-mucosas, fezes, etc.). Para estes materiais o objetivo pode ser encontrar um patógeno específico entre bactérias da microbiota considerada normal na área de onde foi obtida a amostra clínica (*S. pyogenes* em orofaringe, *Salmonella* e *Shigella* em fezes, *N. gonorrhoeae* em secreção uretral, etc). Outras vezes deve-se relatar as bactérias potencialmente patogênicas e descrever a relação entre as colônias isoladas (predomínio de..., presença de... ou raras colônias de...) Ex: Cultura de ferida cirúrgica = predomínio de *S. aureus*, presença de *P. aeruginosa* e raras colônias de *E. coli*, e ignorar raras colônias de *Staphylococcus* coagulase negativo, ou de estreptococos alfa hemolíticos, corineformes, quando bactérias potencialmente patogênicas forem isoladas.

7. IDENTIFICAÇÃO

7.1 meios de cultura

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

- Agar sangue (AS) – meio rico e não seletivo, diferencial para a hemólise, nele crescem a maioria dos Gram negativo e Gram positivo, além de fungos filamentosos (bolors) e leveduras, exceto algumas espécies de hemófilos e outros fastidiosos
- Agar chocolate (AC) – meio rico e não seletivo, permite o crescimento da grande maioria das bactérias aeróbias e facultativas. Quando incubado em CO₂ dá suporte também ao crescimento dos microaerófilos. Pode-se observar halos esverdeados com colônias α- hemolíticas
- Agar MacConkey (MC) – meio seletivo para Gram negativo e diferencial para a utilização de lactose. Deve inibir o crescimento de microrganismos Gram positivo

- Lactose positiva – coloração avermelhada
- Lactose negativa – coloração inalterada
- Como exceção, eventualmente, podem crescer *Enterococcus*, *Candida* e *Bacillus*
- Agar *Salmonella-Shigella* (SS) – meio seletivo para *Salmonella* e *Shigella* e diferencial para a utilização de lactose (coloração rósea) e produção de H₂S (coloração negra)
- Agar Hecktoen Enteric (HE) - meio seletivo para *Salmonella* e *Shigella* e diferencial para a utilização de lactose (coloração alaranjada) e produção de H₂S (coloração negra)
- Agar Thayer Martin Modificado (TMM) – meio seletivo pela adição de colistina, vancomicina e nistatina inibe crescimento de enterobactérias, Gram positivos, fungos e algumas espécies de Neisserias saprófitas. Enriquecido com a adição de complementos para a recuperação de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*

7.2 coloração de Gram

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

- Cachos e tétrades – *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Aerococcus* spp.
- Coco-bacilo (podem formar cadeias curtas)
 - Aos pares – *Enterococcus*
 - Gram variável – *Gardnerella*
 - Em chama de vela – *S. pneumoniae*
- Bacilos
 - Retos e curtos – *Lactobacillus*, *Erisipelotrix*, *Listeria*, *Rhodococcus*
 - Ramificados – *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* (anaeróbico)
 - Diferóides – *Corynebacterium*
 - Esporulados – *Bacillus*, *Clostridium*
- Gram negativos
 - Cocos (visualizados aos pares) – *Neisseria*, *Moraxella*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Veillonella* (anaeróbio)
 - Coco-bacilo - *Haemophilus* (pleomórfico, ora coco-bacilo, ora bacilo), *Brucella*, *Bordetella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Bacteróidesa* (anaeróbicos), Enterobactérias
 - Bacilos
 - Curvos – *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Vibrio*
 - Helicoidais – *Arcobacter* e *Borrelia*. *Leptospira* e *Treponema* (não visíveis ao Gram)
 - Retos – Enterobactérias, não fermentadores
 - Extremidades afiladas – *Fusobacterium* (anaeróbio)

- Extremidade bifurcada – *Bifidobacterium* (anaeróbio)

8. Esquema geral de identificação bacteriana

- 8.1 Analisar o crescimento bacteriano
 - Observar as características das diferentes colônias crescidas em cada meio de cultura utilizado. Lembrar que o tamanho das colônias de um mesmo agente pode ser variável, conforme a proximidade com outras colônias
 - Por exemplo, semeadura em AS e MC:
 - Observar quantos tipos de colônia cresceram em cada agar
 - As colônias que cresceram somente em AS devem ser de microrganismo Gram positivo ou mais exigente
 - Todas as colônias presentes no MC, microrganismos Gram negativo, devem apresentar correspondente no AS
 - A escolha dos meios utilizados para cada material deve estar relacionada aos agentes esperados. A Tabela 3 traz a relação dos principais meio de cultura e o seu perfil de seletividade

Tabela 3- Crescimento dos microrganismos nos principais meios de cultura utilizados na rotina

Mais provável	AC	AS	CLED	MC	SS	Caldo TIO
Gram negativo, leveduras e enterococo	+	+	+	+	+	+
Gram positivo	+	+	+	-	-	+

Gram negativos exigentes	+	+	-	-	-	-
<i>Haemophilus</i>	+	-	-	-	-	-
Anaeróbios	-	-	-	-	-	+*

+Meio dá suporte ao crescimento

- Meio não dá suporte ao crescimento

* Principalmente em coluna alta

- 8.2 Optar entre o crescimento a ser valorizado e o que deverá ser ignorado
 - Muitas vezes é impossível definir o significado clínico de um isolado sem conhecer sua identificação
 - Todo crescimento deve ser classificado como patógeno em potencial ou mero contaminante. Para tanto, deve-se reunir evidências microbiológicas, clínicas e epidemiológicas:
 - Conhecer os principais patógenos esperados para cada material biológico (vide fascículo 2 para maiores detalhes)
 - Obter o máximo de informações sobre o quadro clínico apresentado
 - Os componentes da microbiota residente (*Micrococcus*, *Estafilococos* coagulase negativo, *S. viridans*...) apresentam menor valor preditivo positivo como agentes infecciosos, sendo de fácil interpretação na maioria dos casos. Entretanto, em condições específicas podem participar como agentes patogênicos. Por exemplo:
 - Duas ou mais hemoculturas periféricas com *S. viridans* podem ser consideradas como possível diagnóstico de bacteremia por este agente, devendo ser investigada a possibilidade de endocardite
 - Observar se a cultura é pura ou se existem diferentes tipo de colônias, neste caso, se há predomínio de um tipo.
 - As culturas puras apresentam maior valor preditivo positivo para diagnóstico, especialmente em sítios intensamente colonizados.

Por exemplo: cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Candida* em coprocultura. *Entretanto*, podem ocorrer também como contaminantes. Por exemplo: cultura pura de *S. viridans* em swab de orofaringe

- Sempre que possível, deve-se traçar um paralelo entre os achados da bacterioscopia direta do material e o resultado da cultura, buscando:
 - Valorizar achados de cultura – bacterioscopia com predomínio de cocobacilos pleomórficos em BAL e isolamento de *Haemophilus* em cultura, ainda que em baixas contagens por dificuldades de crescimento
 - Definir contaminantes – presença de abundantes células epiteliais na bacterioscopia da urina não centrifugada ou em escarro, denotando a contaminação com a microbiota local
 - Detectar falhas nas condições de coleta e/ou processamento laboratorial e uso de antimicrobianos– Bacterioscopia de liquor, líquido articular ou secreção conjuntival com diplococos Gram negativo aos pares intracelulares e cultura negativa
 - Caracterização de infecção por anaeróbios - cultura negativa com bacterioscopia revelando microrganismos com características morfológicas de anaeróbios
 - Quantificação – em culturas quantitativas os achados da bacterioscopia direta devem coincidir com as contagens obtidas em cultura (urocultura, BAL, aspirado traqueal ...)
- 8.3 Coloração de Gram das colônias isoladas
 - Sempre que utilizar meio não seletivo
 - Quando utilizar meios seletivos e desejar confirmar a concordância entre a classificação morfotintorial e o meio utilizado
 - Para verificar a presença de leveduras, neste caso o exame direto com salina é suficiente

- 8.4 Direcionamento da identificação

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

- Coco Gram positivo, vide Cap. 2 - *Staphylococcus* e *Streptococcus*
- Coco Gram negativo, vide Cap. 3 - Neisserias e diferencial de *Acinetobacter*.
- Bacilo Gram negativo e oxidase negativa, vide Cap. 4 - Enterobactérias
- Bacilo Gram negativo e oxidase positiva – semear no TSI
Se não fermentador, vide Cap. 5 - Não Fermentadores
Se fermentador, vide Cap. 6 - *Aeromonas* / *Plesiomonas* / *Vibrio*
- Bacilo curvo ou espirilado, vide Cap. 7 - Bacilos Curvos ou Espiralados
- Coco-bacilo Gram negativo que cresce apenas em Ágar Chocolate podendo ou não necessitar de CO₂ vide Cap. 8 - Fastidiosos
- Cocobacilo ou bacilo Gram positivo, vide Cap. 9 - Bacilos Gram positivos
- Bactéria que não cresce em aerobiose, vide Cap. 10 - Anaeróbios estritos

Capítulo 2 - ESTAFILOCOCOS, ESTREPTOCOCOS, ENTEROCOCOS E OUTROS COCOS GRAM POSITIVOS

1. 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 sadios 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, daí a necessidade de 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 importante causa de infecção hospitalar nos dias de hoje, 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 causar surtos, mas que devem ser corretamente identificadas.

2. 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 (72h), à temperatura ambiente. As colônias de estreptococos tendem a ser 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.

2.1. 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 para a família *Streptococcaceae* (estreptococos) é negativa.

Tabela 1 - Divisão dos cocos Gram positivo pela prova da catalase

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

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 cadeia curtas ou aos pares).

Tabela 2 - 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.	V	neg.	Não	não
<i>Aerococcus</i>	neg.	neg.	+	neg.	Não	+
<i>Stomatococcus*</i>	variável	neg.	neg.	neg.	Não	variável

Legenda: neg. = negativo *aderente ao meio

Tabela 3 - Cocos Gram positivo, Catalase negativos, Motilidade Negativos ¹

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

Legenda: ¹ *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* são + S = sensível + = positivo
² *S. pyogenes* é + R = resistente neg = negativo
³ alguns *S. viridans* podem ser + V = variável

3. 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 sub-espécies, 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 plasmó coagulase.

Tabela 4 – 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

Tabela 5 - Identificação das espécies de *Staphylococcus* de maior importância clínica

Espécie	DNase	PYR	Novob.	Uréia	Polimixina	Outras
<i>S. aureus</i>	+	neg	S	variável	R	pig. amarelo
<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	S	+	R	
<i>S. lugdunensis</i>	neg	+	S	variável	variável	ornitina pos.
<i>S. haemolyticus</i>	neg	+	S	neg	S	ornitina neg.
<i>S. saprophyticus</i>	neg	neg	R	+	S	Isolado em urina
<i>S. schleiferi</i>	neg	+	S	neg	S	sacarose neg.
<i>S. intermedius</i>	+	+	S	+	S	
<i>S. hyicus</i>	+	neg	S	variável	R	

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

- *Staphylococcus epidermidis*, causador de infecções de cateteres e próteses e o mais freqüente microrganismo encontrado em hemoculturas.
- *Staphylococcus saprophyticus*, causador de infecção urinária em mulheres jovens.

- *Staphylococcus haemolyticus*, importante devido à resistência aumentada aos antimicrobianos, além da hemólise que apresenta na placa de ágar sangue de carneiro podendo ser confundido com o *S. aureus*

3.1. 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 5µg. As amostras resistentes mostram zonas de inibição de 6 a 12 mm, enquanto susceptíveis apresentam halos de 16 mm ou mais. As cepas de *Staphylococcus saprophyticus* são resistentes.

Tabela 6 - 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

3.2. Identificação dos *Staphylococcus aureus*.

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

a) 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. Coloca-se 2 gotas de salina em uma lâmina e emulsiona-se uma colônia isolada a ser testada, a seguir coloca se uma gota de plasma e mistura-se com um palito de plástico ou madeira, observando 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.

b) 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 efetuada se adicionarmos 0,1 mL

de caldo BHI incubado por uma noite com a colônia suspeita a um tubo de ensaio com 0,5 mL de plasma e incubado a 4 horas a 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.

c) Teste da DNASE – o *Staphylococcus aureus* produz a enzima DNase e a endonuclease termoestável. Este teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA, (DNase test ágar) obtido comercialmente. A evidenciação da positividade pode ser feita pela utilização do meio original adicionado de azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%. O meio adquire uma coloração azul intensa e o aparecimento de uma coloração rósea característica, ao redor das colônias produtoras de DNase, indica a positividade da prova, após incubação de 24 horas a 35°C. O meio adicionado com corante demonstra uma melhor facilidade na leitura, e permite o repique da amostra positiva para teste de sensibilidade aos antimicrobianos, evitando que se retorne à placa original onde nem sempre as colônias estão bem isoladas.

O teste da endonuclease termoestável é efetuado no mesmo meio de DNA, mas colocando-se gotas de caldo de cultura turvo com a colônia suspeita e que foi fervido por 15 minutos. Fazer pequenos orifícios no meio (em placa) utilizando-se canudos de refrigerante. A leitura do teste é semelhante ao da DNase. Note-se que este método pode ser efetuado a partir de caldo de hemocultura em que foi observado o crescimento de cocos Gram positivos agrupados.

d) 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 na parede do *Staphylococcus aureus*.

Como são disponíveis comercialmente, deve-se seguir as instruções do fabricante.

- Teste do crescimento em agar 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, e 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.

e) 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 tétradesdas, 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.

4. 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).

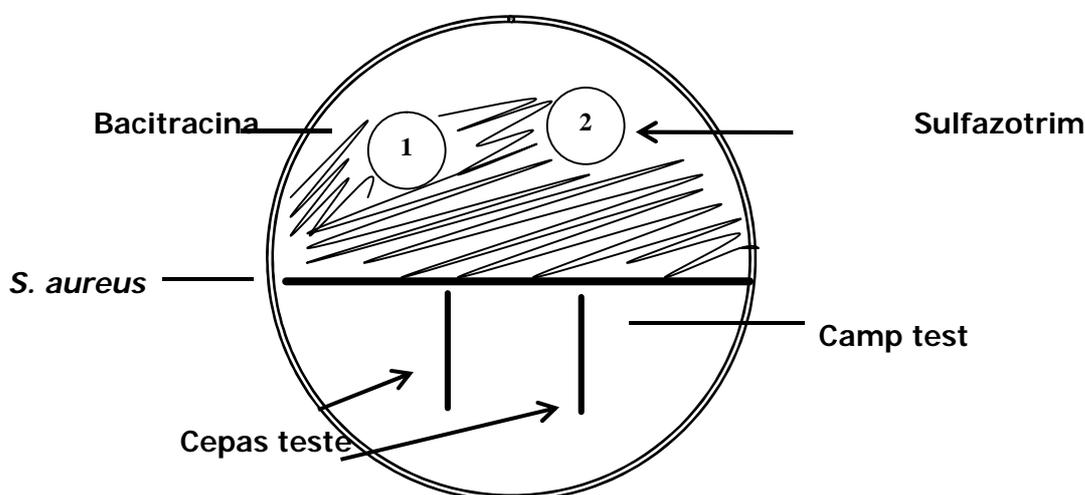
A identificação de espécie de estreptococos beta hemolíticos é feita através de aglutinação com soros específicos contra os antígenos de Lancefield (A, B, C, D, F e G), que constitui uma prova rápida, porém não acessível a todos os laboratórios em virtude do elevado custo.

4.1. 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. Coloca-se se o disco de Bacitracina 0,004 U como indicado e incuba-se por uma noite a 35 ° C sem CO₂ e observa-se qualquer zona de inibição como resultado de sensibilidade. O *Streptococcus pyogenes* (grupo A) é assim rapidamente identificado.

4.2. Teste do Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT)

Adiciona-se na mesma placa de agar sangue o disco de SXT e incuba-se 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, na mesma placa pode ser feito o teste de CAMP, conforme desenho abaixo.



- 1 - Disco de bacitracina
- 2 - Disco de sulfametoxazol-trimetoprima
- 3 - Camp Test
 - linha vertical: estria com cepa beta hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
 - linhas horizontais: cepas teste

4.3. Teste de Camp (na mesma placa)

Inocula-se 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.

Inoculam-se 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 1mm 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. Incuba-se 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 flexa característica, na área de intersecção entre as duas estrias.

4.4. 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 ou podem surgir resultados errôneos. Seguir as instruções do fabricante, já que é 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 ou, na impossibilidade da realização de testes sorológicos de confirmação, reforçar o valor dos testes presuntivos clássicos de identificação do *Streptococcus pyogenes*.

4.5. Teste da bile esculina e do NaCl 6,5 %

Semear também as provas de Bile Esculina e do caldo de NaCl a 6,5% e incubar da mesma forma. O 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.

Tabela 7 - 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>	S	Negativo	negativo	negativos
<i>S. agalactiae</i>	R	Positivo	negativo	negativos
Enterococcus sp	R	Negativo	negativo	positivos
Estreptococo Não A, B ou D.	R	Negativo	positivo	negativos

4.6. 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.

4.7. 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.

Tabela 8 - Identificação de estreptococos gama hemolíticos ou sem hemólise

Identificação	CAMP e hidrólise do hipurato	Bile esculina	Tolerância a NaCl 6,5%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Enterococo</i>	Negativo	Positivo	Positivo
<i>S. bovis</i>	Negativo	Positivo	Negativo

4.8. Identificação dos estreptococos Estreptococos alfa hemolíticos

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

Tabela 7 - Identificação dos estreptococos alfa hemolíticos

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

4.9. Teste da optoquina

Semear um quarto de uma placa de ágar sangue com a cepa alfa hemolítica a ser testada e aplicar um disco de optoquina e incubar a 35⁰C 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*.

4.10. Teste da bile solubilidade

O teste da bile solubilidade também identifica o *Streptococcus pneumoniae*. Pode ser executado em placa ou em caldo. Tomando se um caldo turvo após 3 horas de incubação a 35⁰C inocula se uma suspensão de desoxicolato a 10%. O clareamento da turbidez reflete a lise bacteriana e confere um resultado positivo à prova. O teste em placa consiste de inoculação de gotas de desoxicolato de Sódio a 2% sobre as colônias suspeitas e incubação a 35⁰C 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 e fazer estrias perpendiculares ao sentido da sementeira com *Staphylococcus aureus*, como para a identificação presuntiva de *Haemophilus influenzae* e incubar a 35⁰C em atmosfera com CO₂.

Tabela – 8 Identificação dos enterococos mais importantes clinicamente

Espécie	Arabinose	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	Negativo	Negativo	Variável
<i>E. casseliflavus</i>	Positivo	Variável	Negativo	Positiva	Positivo	Resistente
<i>E. gallinarum</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positiva	Negativo	Resistente

5. BIBLIOGRAFIA

1. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN Jr, W.C. Staphylococci and related organisms in: **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th ed., Lippincot, 1997. 121-170.
2. _____ Streptococci and Streptococcus Like Bacteria. in: **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, Cap 9. 5th ed., Lippincot, 1997. 121-170.
3. MAYHALL, C.G. *Staphylococcus aureus*. In: **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Cap. 17. Williams & Williams, 1996.
4. _____ *Streptococci and Enterococcus* species. In : **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Capítulo 20/21. Williams & Williams, 1996..
5. MURRAY, P. R. et alli. *Staphylococcus* and *Micrococcus* . In: **Manual of Clinical Microbiology**. Cap. 16. American Society for Microbiology. 7th ed. Washington. DC, 1999.
6. _____ Idem capítulo 17 Streptococcus. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Cap. 17. American Society for Microbiology. 7th ed. Washington. DC, 1999.

Capítulo 3 - NEISSERIAS

1. 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 *elongata* difere desta morfologia, sendo diplobacilos ou diplo-cocobacilo. 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 (Cistyne Trypticase Ágar) 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 á sua importância clínica, a maioria das neisserias é comensal vivendo em mucosas de humanos e animais.

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial entre Neisserias e outros cocobacilos Gram negativo

Bactéria	Morfologia	Oxi	Cat	OF Gli	CTA Gli	DNase	Cres AS	MOT
<i>Neisseria meningitidis</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	+	neg
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	neg	neg
<i>Neisseria spp</i>	diplococo/ bacilo	+	v	v (oxidativo)	v	neg	+	neg
<i>Moraxella catharralis</i>	diplococo	+	+	inerte	neg	+	+	neg
<i>Kingella spp</i>	cocobacilo	+	neg	fermentador	+	neg	+	V
<i>Moraxella spp</i>	cocobacilo	+	+	inerte	neg	neg	+	neg
<i>Acinetobacter spp</i>	cocobacilo	neg	+	v (oxidativo)	v	neg	+	neg
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Cocobacilo/ bacilo	+	+	inerte	neg	neg.	+	+

Legenda: Oxi = oxidase, Cat=catalase, OFGli=OF Glicose,CTAGli= utilização da glicose em base Cistina tripticase agar, Cres AS = crescimento em Ágar Sangue, + = positivo, neg = negativo v = variável, Mot = motilidade

a) ***Neisseria gonorrhoeae*** - 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, abscessos vestibular, salpingo-ooforite 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.

b) ***Neisseria meningitidis*** - 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.

c) ***Moraxella (Branhamella) catarrhalis*** - é 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 Nitrocefin (cefalosporina cromogênica). Outras espécies de *Neisseria* raramente são isoladas em casos de endocardite.

2. ISOLAMENTO:

2.1. *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:

- a) utilizar swab com algodão atóxico ou swab de Rayon ou Dacron.
- b) Semear o mais rápido possível nos meios sólidos, e usar placas aquecidas previamente em estufa
- c) 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.
- d) Usar frascos de hemocultura sem o anticoagulante SPS que é inibidor para as *N. gonorrhoeae* (Ex: Caldo BHI com 1% de gelatina).
- e) Em lesões de pele preferir a biópsia que o swab.
- f) Incubar em jarra com umidade e vela
- g) Sempre realizar bacterioscopia pelo Gram

2.2. *Neisseria meningitidis* - Materiais clínicos para isolamento, de acordo com aspectos clínicos: LCR, Sangue (usar frascos de hemocultura sem SPS como anticoagulante), Aspirado de petéquias, sufusões hemorrágicas ou biópsias, Líquido sinovial, Swab de conjuntiva, Aspirado traqueal, ou trans traqueal ou escarro, Swab de nasofaringe (preferível a swab de orofaringe).

2.3. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* - Material clínico adequado para isolamento de acordo com o quadro clínico:

- a) 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.
- b) Sinusite – aspirado de seios da face comprometidos, quando indicado.

- c) Infecções do trato respiratório inferior/pneumonia - Escarro, aspirado traqueal, transtraqueal podem ser úteis ou BAL, quando indicado e comparados com bacterioscopia.

3. 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.

3.1. *N. 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.

- a) 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.
- b) incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO₂ (jarra com vela ou gerador de CO₂)
- c) 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).

3.2. *N. meningitidis* - é um pouco mais tolerante a variações de temperatura, mas recomenda-se para transporte ambientes com CO₂.

- a) 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)
- b) 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* (7,5µg/mL de colistina), Gram positivos (Vancomicina 3 µg/mL) e fungos(13,5µg/mL de nistatina) e contém suplementos para suportar crescimento das *Neisserias meningitidis* e *N. gonorrhoeae*.

3.3. *Moraxella catharralis* - tolera temperatura ambiente e cresce bem em ágar sangue. Material estéril ou com pouca microbiota (LCR, sinovial, sangue, biópsia, conjuntiva, nasofaringe) pode-se usar meio não seletivo

4. BACTERIOSCOPIA E IDENTIFICAÇÃO

4.1. Bacterioscopia – 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 1mL de salina, agitar no Vortex, centrifugar e 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 (+), poucos (++) , moderados (+++) e muitos (++++), descrevendo se os microrganismos são extra-celulares ou intra-celulares, 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-se que neisserias saprófitas ou mesmo *Acinetobacter spp* podem ser diagnosticados erroneamente como *N. gonorrhoeae*.

4.2 Identificação - *N. gonorrhoeae* crescem em ágar chocolate formando colônias pequenas, sendo em geral menores que as de neisserias saprófitas, que apresentam maior tamanho. 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-se 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 fluidos 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.

4.3. 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:

- a) Fazer bacterioscopia das colônias isoladas para confirmar a presença de diplococos Gram negativos com forma de dois feijões.
- b) Fazer o teste de oxidase das colônias sugestivas.

- c) Deve-se procurar afastar outros gêneros de bactérias como *Acinetobacter spp*, *Kingella spp* e *Moraxella spp* que são morfológicamente parecidos.
- d) Um recurso prático para evitar erros de identificação de *Acinetobacter spp* e *Kingella spp* como *Neisserias* é semear o agente suspeito em ágar chocolate e colocar um disco de penicilina de 10UI. 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*.
- e) 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).
- f) 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 Cistina Tripticase agar (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.

Tabela 2.- 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	v	v	v	v	v
<i>M. catharralis</i>	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Kingella spp</i>	v	+	neg	+	neg	neg	neg	neg

Legenda: AC = ágar chocolate; A. nut. = ágar nutriente ;
 GLI = glicose; Mal = maltose; Lac = lactose; Sac = sacarose; Fru = frutose

5. REFERÊNCIAS

1. ESCHENBACH, D.A., POLLOCK, H.M., SCHACHTER, J. CUMITECH 17. **Laboratory diagnosis of female genital tract infection**. Coord. Ed. S.J. Rubin. ASM. Washington, D.C., 1983.
2. EVANGELISTA, E.T., BEILSTEIN, H.R. CUMITECH 4A . **Laboratory diagnosis of gonorrhoea**. Coord. Ed. C. Abramson. ASM. Washington, D.C. 1993.
3. FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 10th Ed. St. Louis. Mosby, 1998.
4. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRENKENBERGER, P.C.,; WINN Jr., W.C. **Diagnostic Microbiology. Color Atlas and Textbook**. 5th Ed. Lippincott, 1997.
5. THAYER, J.D., MARTIN, J.E. Jr. A selective medium for the cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. Public Health Rep., **79**: 49 - 57, 1964.

Capítulo 4 - ENTEROBACTÉRIAS:

1. 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.

1.1. 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 (Mc Conkey, EMB). Outras características: são anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose), fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos, 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.

1.2. Importância clínica:

- a) A maioria das enterobactérias é encontrada no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais.
- b) 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.
- c) As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica,
- d) são responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias.

1.3. Infecções na comunidade e hospitalares

- a) Nas infecções da comunidade destacam-se: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*.
- b) Nas infecções hospitalares as enterobactérias que atualmente predominam: *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 spp</i> | - <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> |
| - <i>Salmonella typhi</i> | - <i>Klebsiella oxytoca</i> | - <i>Enterobacter cloacae</i> |
| - <i>Salmonella spp</i> | - <i>Providencia spp</i> | - <i>Enterobacter agglomerans</i> |
| - <i>Citrobacter freundii</i> | - <i>Serratia spp</i> | - <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| - <i>Proteus mirabilis</i> | - <i>Proteus vulgaris</i> | - <i>Morganella morganii</i> |

Tabela 1 - Principais provas para a identificação das enterobactérias de importância clínica:

fermentação da glicose	produção de gás (CO ₂)
fermentação da lactose	oxidase
motilidade	produção de indol
utilização de citrato	produção de urease
descarboxilação da lisina	produção de fenilalanina desaminase ou opção triptofanase
produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	produção de gelatinase ou opção DNase

Tabela 2 - 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, 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.

2. TIPOS DE TESTES UTILIZADOS

- a) Podem ser utilizados testes preparados no laboratório, desde que submetidos a controle de qualidade.
- b) Adquiridos no comércio em testes isolados ou em kits acompanhados dos respectivos esquemas de identificação.
- c) Métodos automatizados em geral utilizam estas mesmas provas e ampliam o número de testes podendo caracterizar com maior segurança e melhor poder de discriminação gêneros e espécies não comuns.
- d) 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.

2.1. Principais Meios Bioquímicos Utilizados na Rotina

2.1.1. 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: *E. coli*, *Shigella* (indol positiva), *Shigella* (indol negativa), *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella spp* (sacarose negativa), *Enterobacter cloacae*, *Providencia spp* (uréia positiva) ou *Morganella morganii*, *Providencia spp* (uréia negativa), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella spp*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* (necessita provas complementares), *Vibrio cholerae*, *Vibrio spp*, Bactérias não fermentadoras.

a) 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 o testes complementares, como Citrato e a fermentação da lactose verificada no crescimento em ágar Mc Conkey.

b) 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

2.1.2. 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.

a) Tubo EPM: fermentação da glicose, produção de gás, H₂S, uréia, fenilalanina inocular picando até o fundo e semear na superfície, incubar com a tampa frouxa 24hs/35°C.

Tabela 3 – 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

b) Tubo MiLi - Fazer picada central apenas – incubar 24hs/35°C

- Motilidade – bactérias móveis crescem além da picada turvando o meio, enquanto as imóveis crescem apenas na linha de picada.
- descarboxilação da lisina - lisina positivo o meio torna-se roxo, na prova negativa o meio permanece amarelado nos 2/3 inferiores.
- Após a leitura da lisina adicionar 3 gotas de reativo de Kovacs para o teste de indol - a formação de um anel rosa na superfície do meio indica positividade para o indol.

c) Citrato – inocular a superfície e incubar 24hs/35°C

- A prova positiva é evidenciada pelo aparecimento de coloração azul na superfície.

2.1.3. Meio Tríplice Açúcar 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 está 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.

Tabela 4 – Provas do Meio de TSI

1. Púrpura/amarelo (ápice púrpura e base amarela) = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos)
2. Amarelo/amarelo (ápice e base amarelas) = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares)
3. Presença de gás (CO₂) = bolhas ou meio fragmentado
4. H₂S positivo = presença de precipitado negro

Tabela 5 - 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	V	Enterobactéria ou <i>Aeromonas</i> lactose e sacarose negativas
Amarelo	Amarelo	Neg	V	Enterobactéria
Amarelo	Amarelo	Pos	V	<i>Salmonella, Proteus/Morganella/Providencia e Citrobacter</i>

Neg = negativo v= variável

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*)

3. ETAPAS DA IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

a. 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: agar sangue e Mac Conkey

Líquidos nobres e biópsias: Agar chocolate e Mac Conkey

Fezes: Mac Conkey e SS.

Urina: CLED ou agar sangue e Mac Conkey, etc.

Devemos considerar que :

A enterobactéria sempre cresce nos meios ricos (agar sangue, chocolate e CLED), bem como nos meios seletivos: agar Mac Conkey e SS.

Os Gram positivos como regra não crescem em agar Mac Conkey e SS, exceto os enterococos que podem crescer.

No agar Mac Conkey e SS, 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 a seguir realizar:

- b. Gram da colônia isolada** – Recomenda-se sempre fazer o Gram para evitar enganos de interpretação (diferenciar cocos de bacilos, Gram positivos de Gram negativos e leveduras).
- c. Prova da oxidase** - indicada para detectar e/ou diferenciar o grupo *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* que também são fermentadores.
- d. Prova do metabolismo fermentador** - triagem utilizando os meios de OF-glicose(quando suspeitar de não fermentador), TSI (Tríplice Açúcar Ferro) ou EPM (Rugai sem sacarose), para enterobactérias.
- e. Série bioquímica complementar** – sempre necessária para caracterizar gênero e espécie. O número de provas vai permitir maior ou menor discriminação(vide a seguir 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 (Triplice Açúcar erro), 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 - realizar as provas do nível 1 mais:**

Ornitina, arginina, sacarose, arabinose, malonato, esculina e PYR.

3.1. Descrição das Principais Provas Bioquímicas

a) Motilidade / H₂S / Indol - Semear por picada até o fundo, e incubar 24hs/35°C.

Motilidade - Para testar motilidade pode-se utilizar os meios de Motilidade/indol com resazurina; SIM (motilidade, indol e H₂S) e Mili (Motilidade, Indol e Lisina)

- Crescimento apenas na linha de picada = motilidade negativa
- Crescimento difuso em todo o meio = motilidade positiva

H₂S – Produção de gás sulfídrico, verificado no TSI ou SIM

- H₂S positivo = meio enegrecido
- H₂S negativo = cor inalterada do meio

Indol - Após 24h de incubação, pingar 3-4 gotas de Kovacs na superfície do meio

- presença de cor púrpura = indol positivo
- cor do reagente = indol negativo

b) Ureia de Christensen - inoculado apenas na superfície e incubar 24h/35°C

- Urease positivo = cor vermelha (*Proteus* apresenta reação mais intensa)
- Urease negativo = mantém cor amarelada do meio

c) Citrato de Simmons - inocular na superfície e incubar 24h/35°C

- Citrato positivo = azul e/ou crescimento no meio

- Citrato negativo = cor verde (inalterado)

d) Fenilalanina - Inocular a superfície do meio (inclinado) e Incubar 24h/35°C, após crescimento pingar na superfície 5 gotas do reagente cloreto férrico a 10%

- FA positivo = cor verde escuro na superfície
- FA negativo = mantém a cor do meio inalterada

4. IDENTIFICAÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

4.1. - Considerações

- a)** 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
- b)** 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%.
- c)** Quando o PB é baixo significa ter outro padrão mais frequente.
- d)** Os padrões bioquímicos pouco frequentes, terão menor probabilidade de isolamento.
- e)** Não é aplicado quando se considera gênero pois envolve várias espécies com diferentes padrões de testes (ex: *Salmonella spp*).
- f)** Valores seguidos do sinal positivo (+) ou negativo (-) significa o percentual de cepas com resultado do teste positivo ou negativo. Ex: Lisina 75%+ = 75% das cepas são lisina positivas;
- g)** 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*.
- h)** 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.

- i) As provas destacadas com fundo cinza têm a finalidade de facilitar a busca de provas-chave na diferenciação bacteriana.
- j) 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.

**Tabela 5 – Identificação Bioquímica Simplificada das Principais Enterobactérias
NÍVEL DE COMPLEXIDADE 1**

5.1 - H₂S (gás sulfídrico) positivo, Fenilalanina positivo #

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

5.2 - H₂S negativo , Fenilalanina positivo #

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

5.3 - H₂S positivo, Fenilalanina negativo #

a) Indol positivo #

Bactérias / Provas	citrato	Motilidade	urease	lisina	lac (MC)	PB#
<i>Citrobacter freundii</i>	78%+	89%+	v	neg	+	25%
<i>Edwardsiella tarda</i>	neg	+	neg	+	neg	99%

Lac MC= lactose em Mc Conkey

b) Indol negativo #

Bactéria/ Provas	urease	citrato	lisina	motilidade	gás	sorotipagem	PB#
<i>Salmonella spp</i>	Neg	+	+	+	+	+	
<i>S. typhi</i>	Neg	neg	+	+	neg	+	97%
<i>S. gallinarum/ S. pullorum</i>	Neg	neg	+	neg	v	+	90%
<i>C. freundii</i>	V	+	Neg	+	+	Neg	52%

5.4 - H2S negativo , FA negativo , Indol positivo, motilidade negativa

Bactéria/Provas	citrato	urease	Lisina	lactose	gás	sorotipagem	PB#
<i>Y. enterocolitica</i> ¹	Neg	75%+	Neg	Neg	Neg	+ Yersinia	50%
<i>Shigella spp</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+Shigella	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	+	Não	99%
<i>E.coli inativa (rara)</i>	Neg	Neg	V	75%Neg	Neg	Invasora ²	80%

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

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

5.5 - H2S negativo , FA negativo , Indol positivo, Motilidade positiva

Bactérias/Provas	citrato	Urease	lisina	lactose	gás	PB#
<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	+	+	97%
<i>Citrobacter spp</i>	+	V	Neg	V	+	
<i>Aeromonas spp</i> ¹	V	Neg	+	Neg ²	v	

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

Aeromonas Dnase positiva e *Plesiomonas* Dnase negativa

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

5.6 - H2S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Provas / Bactérias	urease	citrato	lisina	gás	lactose	comentário	PB#
<i>Shigella spp</i> (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	pos	pos	pos	pos	pos	Colônia mucóide	100%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	75%+	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>E. agglomerans</i> ³	Neg	V	neg	neg	V	15% mot 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

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

Bact/Provas	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	V	Negativa	25%

5.8 - H₂S negativo , FA neg., Indol neg., Motilidade positiva, Citrato positivo

a) DNase /gelatinase negativos

Provas/bactérias	lisina	urease	Lactose	gás	Sorotip.	PB#
<i>Enterobacter aerogenes</i>	pos	neg	Pos	++	neg	95%
<i>Enterobacter cloacae</i>	neg	v	Pos	++	neg	95%
<i>Salmonella typhi</i>	pos	neg	Neg	neg	+	12%

b) DNase /gelatinase positivos= *Serratia spp*#

Provas/bactérias	lisina	urease	Lactose	gás	pig. verm.	PB#
<i>Serratia marcescens</i>	pos	85% neg	Neg	55% pos	V	95%
<i>Serratia liquefaciens</i>	pos	neg	90% neg	75% pos	neg	76%
<i>Serratia rubidae1</i>	55% Pos	neg	Pos	70% neg	V	85%

1 – raramente isolada

**Tabela 6 – Identificação Bioquímica Simplificada das Principais Enterobactérias
NÍVEL DE COMPLEXIDADE 2**

6.1- H₂S positivo, Fenilalanina positivo

Indol positivos#

Bactérias / Provas	ornitina	Sacarose	PB#
<i>Proteus vulgaris</i>	neg	+	92%
<i>Morganella morganii</i>	+	Neg	20%

Indol negativos

	ornitina	Citrato	PB#
<i>Proteus mirabilis</i>	+	V (65%+)	94%
<i>Proteus penneri</i>	neg	Neg	30%

6.2- H₂S negativo, Fenilalanina positivo

a) Indol negativo

Bactéria / Provas	urease	citrato	Sacarose	ornitina
<i>Proteus penneri</i>	+	neg	+	neg
<i>Morganella morganii</i>	+	neg	neg	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	neg	+	75%+	neg
<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	+	+	+

b) Indol positivo

Bactéria / Provas	citrato
<i>Morganella morganii</i>	neg
<i>Providencia spp</i>	+

6.3 - H2S positivo, Fenilalanina negativo

a) Indol positivo

Bactéria / Provas	citrato	urease	Lisina	ornitina	lactose	sacarose
<i>Citrobacter freundii</i>	78% +	44% +	Neg	neg	78 %+	89%+
<i>Edwarsiella tarda</i>	neg	neg	+	+	neg	neg

b) Indol negativo

Bactérias/ Provas	Uréia	Citrato	Lisina	Ornitina	Motilidade	arabinose	Gás	Sorotip.
<i>Salmonella spp</i>	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+

Bactéria/prova	PYR	Fenilalanina
<i>Salmonella spp</i>	neg	neg
<i>Citrobacter spp</i>	+	neg
<i>Proteus spp</i>	neg	+

6.4 - H2S negativo, Fenilalanina negativo, Indol positivo, Motilidade negativa

Bactéria / Provas	citrato	urease	lisina	ornitina	lactose	gás	sorotip.	PB#
<i>Y. enterocolitica</i>	neg	75% +	Neg	+	neg	neg	+	50%
<i>Shigella spp</i>	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	Invasora2	80%

1- positiva à temperatura ambiente e negativa a 37C

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

6.5 - H2S negativo, Fenilalanina negativo, Indol positivo, motilidade positiva

Bactérias / Provas	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 spp</i> ³	V	neg	+ ⁴	+	neg	v	

1 - *C. koseri* = malonato+, *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

6.6 - H2S negativo, Fenilalanina negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Provas / bactérias	urease	citrato	lisina	gás	lactose	comentário	PB#
<i>Shigella spp</i> (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	Serotipagem positiva	>50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	Colônia Mucóide	100%
<i>Klebsiella spp</i> ¹	neg	V	V	V	V	Mucóide	
<i>Citrobacter freundii</i>	V	78%+	neg	+	78%+	11% motilidade negativa	16%
<i>Yersinia enterocolitica</i> ²	75%+	neg	neg	neg	neg	Serotipagem positiva	50%
<i>E. agglomerans</i> ³	neg	V	neg	neg	V	15% motilidade negativa	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)

6.7 - H2S negativo, Fenilalanina neg, Indol negativo, Motilidade +, Citrato neg#

Bactéria / Provas	Lisina	Ornitina	Lactose	Urease	Arabinose	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 a 35°C e positiva a 25°C

6.8 a - H₂S negativo, FA negativo, Indol neg., Motilidade negativa, Citrato positivo #**Dnase e Gelatina negativos**

Bactérias/ Provas	Uréia	Fenil	Lisina	Arginina	Ornitina	Malonato	Gás	Lactose	Esculina
<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%+

6.8 b – versão simplificada para interpretação das provas da tabela 8a**Lisina negativa****Ornitina negativa**

<i>Citrobacter freundii</i>	Gas +	Esculina neg	Arginina v
<i>E. agglomerans</i>	Gás neg	Esculina v	Arginina neg

Ornitina positiva

<i>Enterobacter cloacae</i>	urease 65%+	FA neg	Malonato 75% +	esculina 30% +	+ comum
<i>Enterobacter sakazaki</i>	urease neg	FA50%+	Malonato 18% +	esculina +	raro

Lisina positiva

<i>E. aerogenes</i>	urease neg	Lactose positivo
<i>Enterobacter gergoviae</i>	urease pos	Lactose variável

6.9 - H₂S neg., Fenilalanina neg., Indol neg., Motilidade positivo, Citrato positivo #**Dnase e Gelatina (positivas)**

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

Tabela 7a - Caracterização geral das principais enterobactérias de importância clínica (%)

Bactérias\provas	Indol	Citrato	H₂S	Uréia	Fenilala	Lisina	Arginina	Ornitina	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 grupo</i>	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 spp</i>	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 A</i>	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 outras</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 bio !</i>	0	30	0	0	0	55	4	65	17
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	90	0	3	0	95	0	95	95
<i>Serratia rubidae</i>	0	95	0	2	0	55	0	0	85
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	0	0	75	0	0	0	95	2

Tabela 7a - Caracterização geral das principais enterobactérias de importância clínica (%)

Bacterias\provas	gelatina	Malonato	Gás glicose	lactose	sacarose	esculina	DNase
<i>Citrobacter freundii</i>	0	11	89	78	89	0	0
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	0	95	98	50	40	1	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	1	97	35	9	5	0
<i>Edwarsiella 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 choleraesuis</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 outras</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

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 dividir-se 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* *Yersina enterocolitica* e mesmo assim utilizando-se esquemas simplificados, através do seguinte procedimento técnico:

- a)** Preparar uma suspensão bastante densa (aspecto leitoso), da bactéria a ser testada, utilizando-se solução salina a 0,85%. A massa bacteriana é proveniente do Agar TSI usado na identificação bioquímica ou, de preferência, em agar nutriente inclinado após repique para obtenção de massa de germes. Coloca-se a salina sobre o crescimento bacteriano ocorrido na superfície inclinada do meio, e após alguns minutos, agitar o tubo de modo a obter a suspensão bacteriana. Bactérias em fase rugosa tendem a se auto aglutinar, e não devem ser utilizadas na classificação sorológica.
- b)** 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.
- c)** 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 resfriamento da suspensão repete-se o teste. Caso ocorra a aglutinação, confirma-se a prova.

5.1 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, utiliza-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	-	+
Anti Vi	+	-

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 O ₂ (A)	<i>Salmonella paratyphi A</i>
Grupo O ₄ (B)	<i>Salmonella paratyphi B</i> e <i>S. typhimurium</i>
Grupo O ₇ (C ₁)	<i>Salmonella paratyphi C</i> e <i>S. cholerae suis</i>
Grupo O ₅ (D ₁)	<i>Salmonella typhi</i>

5.2 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, primeiro 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.

5.3 Identificação de *Escherichia coli*:

As amostras de *Escherichia coli* que causam diarreia pertencem a três grupos principais: Enteropatogênicas (**EPEC**), Enterotoxigênicas (**ETEC**) e 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-se cerca de cinco colônias características a partir do Agar BEM ou Mc Conkey, para um tubo contendo Agar Nutriente Inclinado, com finalidade de obter massa de germes. É feita então uma suspensão bacteriana em solução salina, a qual será testada utilizando-se 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:

1. 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.
2. Bactérias que não se enquadram nos padrões definidos acima, recorrer a testes suplementares como os descritos abaixo ou usar kits com maior número de provas ou em caso de importância clínica (descritos acima) enviar a Laboratório de Referência.

6. REFERENCIAS :

1. BARON, E.J., FINEGOLD, S.M. - **Bailey and Scott's. Diagnostic Microbiology.** 8th Ed. St. Louis, Mosby, 1990.
2. CHRISTENSEN, W.B. - Ureia decomposition as means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bacteriol, **52**: 461-466, 1946.
3. FARMER III, J.J., KELLY, M.T. - Enterobacteriaceae. IN: Balows A.; Hausler, W.J. Jr.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D. & Shadomy, H.J.(Eds.) **Manual of Clinical Microbiology.** 5th Ed. ASM. Washington, D.C., 1991.
4. FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 10th Ed. St.Louis. Mosby, 1998.
5. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRENKENBERGER, P.C., WINN Jr., W.C. **Diagnostic Microbiology – Color Atlas and Textbook.** 5th Ed. Lippincott, 1997.
6. Mc FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Baltimore. Ed. William & Wilkins Co., 1980.
7. MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** American Society for Microbiology 7th ed. Washington DC. 1999.
8. OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica,** Sarvier, 2000 São Paulo Brasil, 254p.
9. RHODEN, R.A., HERMANN, G.J. **Isolation and identification of *Enterobacteriaceae* in the clinical laboratory.** U.S. DHEW. Center for Disease Control. Atlanta Ga., 1974.
10. SACK, R.B., TILTON, R.C., WEISFELD, A.S. CUMITECH 12. **Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea.** Coord. Ed. S.J. Rubin. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1980.
11. TOLEDO. M.R.F., FONTES, C.F., 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.
12. TOLEDO. M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. MILi – Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol. **13(04)**: 230 - 235, 1982.

Capítulo 5 - BASTONETES NÃO FERMENTADORES

1. 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, daí a importância de 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.

Quadro 1 - BNFs de importância clínica consideradas neste capítulo*:

<i>Acinetobacter spp*</i>	<i>Alcaligenes spp *</i>
<i>Achromobacter spp</i>	<i>Bordetella bronchyseptica</i>
<i>Burkholderia cepacia*</i>	<i>Chryseobacterium (Flavobacterium) spp*</i>
<i>Methylobacterium spp</i>	<i>Moraxella spp*</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>P. luteola</i>	<i>P. oryzihabitans</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Ps pseudomallei*</i>	<i>Roseomonas spp</i>
<i>Stenotrophomonas spp*</i>	<i>Shewanella spp</i>
<i>Sphingobacterium spp</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Quadro 2 - Testes necessários para a identificação de rotina dos BNFs

tubo de OF Glicose (com vaselina)	disco de oxidase
tubo de OF Glicose (sem vaselina)	disco de PYR
tubo com lisina	tubo com arginina
tubo controle de aminoácidos	caldo TSB para motilidade em lâmina
tubo agar citrato	caldo TSB crescimento 42°C
tubo agar uréia	tubo de caldo indol
tubo com agar esculina	disco de polimixina
tubo com TSI	placa de Mac Conkey
tubo com gelatina	placa de DNase
tubo com caldo NaCl 6,5%	

1.1. SEMEADURA DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO: a partir de colônias isoladas em cultura pura com 24 horas de crescimento, nos meios de inoculação primária, proceder a realização das técnicas de identificação e diferenciação dos BNFs:

- a) disco de oxidase - com alça retirar 2-3 colônias e esfregar sobre a fita ou disco teste (pode-se umedecer o papel com 1 gota de salina estéril)
- b) tubo de OF Glicose (com vaselina) - picar com agulha até o fundo do tubo
- c) tubo de OF Glicose (sem vaselina) - picar com agulha até o fundo do tubo
- d) tubo com pedaço de filme com gelatina - inocular 2-3 colônias na salina e deixar o fragmento imerso
- e) placa de DNase - semear 2 a 3 colônias em "spot" (círculo de 1 cm de diâmetro)
- f) tubo com lisina - usar inóculo **denso** e pode-se adicionar 2 ml de vaselina líquida
- g) tubo com arginina - usar inóculo **denso** (igual lisina)
- h) tubo controle de aminoácidos - (igual lisina)
- i) uréia - semear com agulha inóculo **denso** na superfície do meio
- j) citrato - semear com agulha na superfície do meio
- k) caldo TSB crescimento 42°C - semear 2 colônias no caldo

- l) caldo TSB motilidade - semear 2 colônias no caldo
- m) tubo com caldo NaCl 6,5% - semear 2 a 3 colônias no caldo
- n) tubo com agar esculina - semear 2 a 3 colônias na superfície do meio
- o) tubo de caldo indol - inocular 2 colônias no caldo
- p) disco de polimixina - fazer antibiograma em Mueller Hinton e colocar o disco
- q) disco de PYR - colocar o disco sobre colônias de crescimento recente ou fazer suspensão densa e depositar 3 a 4 gotas sobre o disco de PYR e incubar durante 4 horas numa placa vazia com umidade.
- r) placa de Mac Conkey - semear com alça 1 colônia isolada
- s) TSI - Semear com agulha picando até o fundo do tubo e na superfície do agar inclinado.

1.2. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS:

- a) disco de oxidase - 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 *Burkholderia cepacia* pode dar reação fraca.
- b) tubo de OF Glicose (com vaselina) / tubo de OF Glicose (sem vaselina):
 - OF Glicose Fermentador - dois tubos ficam amarelos (ácido)
 - OF Glicose Oxidativo - tubo sem vaselina amarelo, tubo com vaselina verde
 - OF Glicose 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.
- c) tubo com gelatina - incubar 30°C, se negativo aguardar no mínimo 72h. Se positivo ocorre precipitado cinza no fundo do tubo.
- d) placa de DNase - adicionar ácido clorídrico e aguardar 5 minutos. Observar a presença de halo transparente em volta do inoculo positivo enquanto o restante do meio fica leitoso. Se negativo repetir o teste com leitura em 72h.

- e) tubo com lisina / tubo com arginina / tubo controle de aminoácidos - comparar os tubos testes dos aminoácidos com o controle negativo. O tubo controle negativo deve ficar azul esverdeado pálido e as provas positivas ficam de cor púrpura. Se negativo aguardar até 5 dias.
- f) disco de polimixina - qualquer halo em torno do disco significa sensibilidade
- g) tubo agar uréia - a cor rosa forte aparece em todo o meio após 24 a 72 h de incubação, ligeira mudança de cor rósea no ápice, que não progride com maior tempo de incubação, é considerado negativo. *Bordetella bronchiseptica* pode dar reação positiva em 4 h.
- h) tubo agar citrato - a cor azul forte aparece no pico, e com maior incubação estende-se a todo o meio.
- i) caldo TSB crescimento 42°C - ocorre turbidez no meio ou é nítido o aumento da densidade bacteriana. Ideal comparar com controle mantido a temperatura ambiente.
- j) caldo TSB para motilidade - 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).
- k) tubo com caldo NaCl 6,5% - a presença de turbidez e mudança de cor indicam crescimento.
- l) tubo com agar esculina - ocorre precipitado negro intenso nas provas positivas a partir de 6 horas de incubação até 48 h. Cor castanho escuro é prova negativa.
- m) tubo de caldo indol - colocar 5 gotas de xilol e agitar vigorosamente o tubo. Adicionar 5 gotas do reagente de Erlich ou Kovacs. Observar a presença de anel púrpura pálido ou intenso que revelam prova positiva.

- n) disco de PYR – colocar o disco teste em contato com o crescimento bacteriano, em seguida colocá-lo sobre uma lâmina e 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.
- o) placa de Mac Conkey - crescimento deve ocorrer entre 1 a 3 dias.
- p) TSI - Verificar padrão 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.

2. 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, Oxidase.

Observar se há pigmento da colônia crescida (amarelo, róseo, cor metálica).

2.1. RESULTADO DO GRAM E OXIDASE:

a) **Gram Positivo:** procurar a identificação de cocos e bacilos Gram positivos

b) **Gram negativo:**

- Cocco Gram negativo, oxidase positivo, identificar como *Neisseria spp* ou seguir para a Tabela 3.2.
- Cocco Gram negativo, oxidase negativo, seguir para Tabela 3.1

c) **Bacilo Gram negativo**, oxidase negativo, semear:

- TSI, MILi, Fenilalanina, Citrato, Uréia (ou EPM MILi ou IAL)
- OF glicose e Caldo motilidade – seguir 2.2.1

d) **Bacilo Gram negativo**, oxidase positivo, semear:

- OF Glicose e Caldo motilidade – seguir 2.2.2

2.2. RESULTADO DO OF:

2.2.1. -bacilo (cocobacilo) Gram negativo oxidase negativo

a) **OF Glicose fermentador** - fazer a identificação com as provas realizadas visto ser uma enterobactéria. Vide capítulo enterobactérias para interpretação dos resultados.

b) **OF não fermentador**: motilidade negativa: Tabela 3.1

motilidade positiva: Tabela 3.3

2.2.2. Bacilo Gram negativo oxidase positiva:

OF Glicose fermentador - pesquisar *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*

OF Glicose não fermentador: se pigmento rosa segue Tabela 3.7

- motilidade negativa e pigmento amarelo, segue Tabela 3.4

- motilidade positiva: se TSI com H₂S segue Tabela 3.5 a e 3.5 b

se OF glicose Oxidativo segue Tabela 3.5

se OF glicose Inerte segue Tabela 3.6

3. TABELAS DE IDENTIFICAÇÃO DOS BNFS

Tabela 3.1a - Coco-bacilos ou cocos Gram negativo, oxidase neg. e motilidade neg.

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>	I/O	neg	+	+
<i>A. lwoffii</i>	I	neg	neg	Neg

Legenda: I = inerte O = oxidativo neg = negativo pos + positivo

Tabela 3.1b - Prova opcional

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

*hemólise em agar sangue

Tabela 3.2 - Cocos Gram negativo, oxidase positivo, motilidade neg., OF-Gli Inerte

Microrganismos / Provas	Urease	Gelatina	Dnase	MacConkey
<i>Moraxella(B). catarrhalis</i>	Neg	Neg	Pos	Neg
<i>Moraxella canis</i>	Neg	Neg	Pos	Pos
<i>M. fenilpiruvica/ureolytica</i>	Pos	Neg	Neg	Pos
<i>Moraxella lacunata</i>	Neg	Pos	Neg	Neg
<i>Moraxella spp*</i>	Neg	Neg	Neg	Var

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

Tabela 3.3 - Bacilos Gram negativo, oxidase negativa, motilidade positiva, OF-Gli Oxidativo ou Inerte

Microrganismos / Provas	Arginina	Dnase	Lisina	Polimixina *
<i>Pseudomonas luteola</i>	Pos	Neg	Neg	S
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Neg (14+)	Neg	Neg	S
<i>B. cepacia</i>	Neg	Neg	80%+	R
<i>S. maltophilia</i>	Neg	Pos	93%+	S

* Fazer antibiograma com polimixina

Provas opcionais

Microrganismos / Provas	Esculina	PYR	Imipenem*
<i>Pseudomonas luteola</i>	Pos	Neg	S
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Neg	Neg	S
<i>B. cepacia</i>	Var	Pos	Var
<i>S. maltophilia</i>	Var	pos	R

* Fazer antibiograma com imipenem

Tabela 3.4 - Oxidase positiva, Motilidade negativa e OFG Oxidativo, Bacilos c/ pigmento amarelo e Crescimento em MC variável

Microrganismos / Provas	Indol	Dnase	Polimixina	Uréia
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Pos	Pos	R	Neg
<i>C. indologenes</i>	Pos	Neg	R	Neg
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Neg	Neg	S	Neg

<i>Sphingobacterium spp*</i>	Neg	Variável	R	Pos
------------------------------	-----	----------	---	-----

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

Tabela 3.5a - Bacilos Gram negativo, oxidase positiva, motilidade positiva, OF GLI Oxidativo - vide fluxograma para facilitar interpretação

Microrganismos	POL	LIS	ARG	NaCl 6,5%	GEL	42°C	Característica
<i>A. xiloxidans</i>	S	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos (86)	
<i>P. aeruginosa</i>	S	Neg	pos		82	Pos	Pigmento
<i>P. fluorescens</i>	S	Neg	pos		Pos	Neg	
<i>P. putida</i>	S	Neg	pos		Neg	Neg	
<i>P. stutzeri</i>	S	Neg	Neg	Pos	Neg	v	Seca
<i>B. pseudomallei</i>	R	Neg	pos		+79%	pos	
<i>B. cepacia</i>	R	80%+	Neg		20%+	83%+	
<i>S. paucimobilis*</i>	S	Neg	Neg		Pos	Neg	Pigm.Amarelo
<i>Shewanella spp</i>	S	Neg	Neg	V	V	v	

* Mot += Temperatura ambiente

Provas complementares ^{1,2}

Microrganismos	Esculina*	PYR*
<i>A. x. xiloxidans</i>	Neg	Pos
<i>P. aeruginosa</i>	neg	V
<i>P. fluorescens</i>	Neg	V
<i>P. putida</i>	Neg	Neg
<i>P. stutzeri</i>	neg	Neg
<i>B. pseudomallei</i>	V	Neg
<i>B. cepacia</i>	V	Neg
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	pos	25+
<i>Shewanella spp</i>	neg	Pos

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

Tabela 3.5.b - Bacilos Gram negativos não fermentadores oxidase positiva, motilidade positiva, com H₂S no TSI, OF Glicose Variável, DNase positivos

Bactéria/prova	Cresc. 42oC	Cresc NaCl 6,5%
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Neg	Neg
<i>Shewanella alga</i>	Pos	Pos

FLUXOGRAMA AUXILIAR PARA TABELA 5

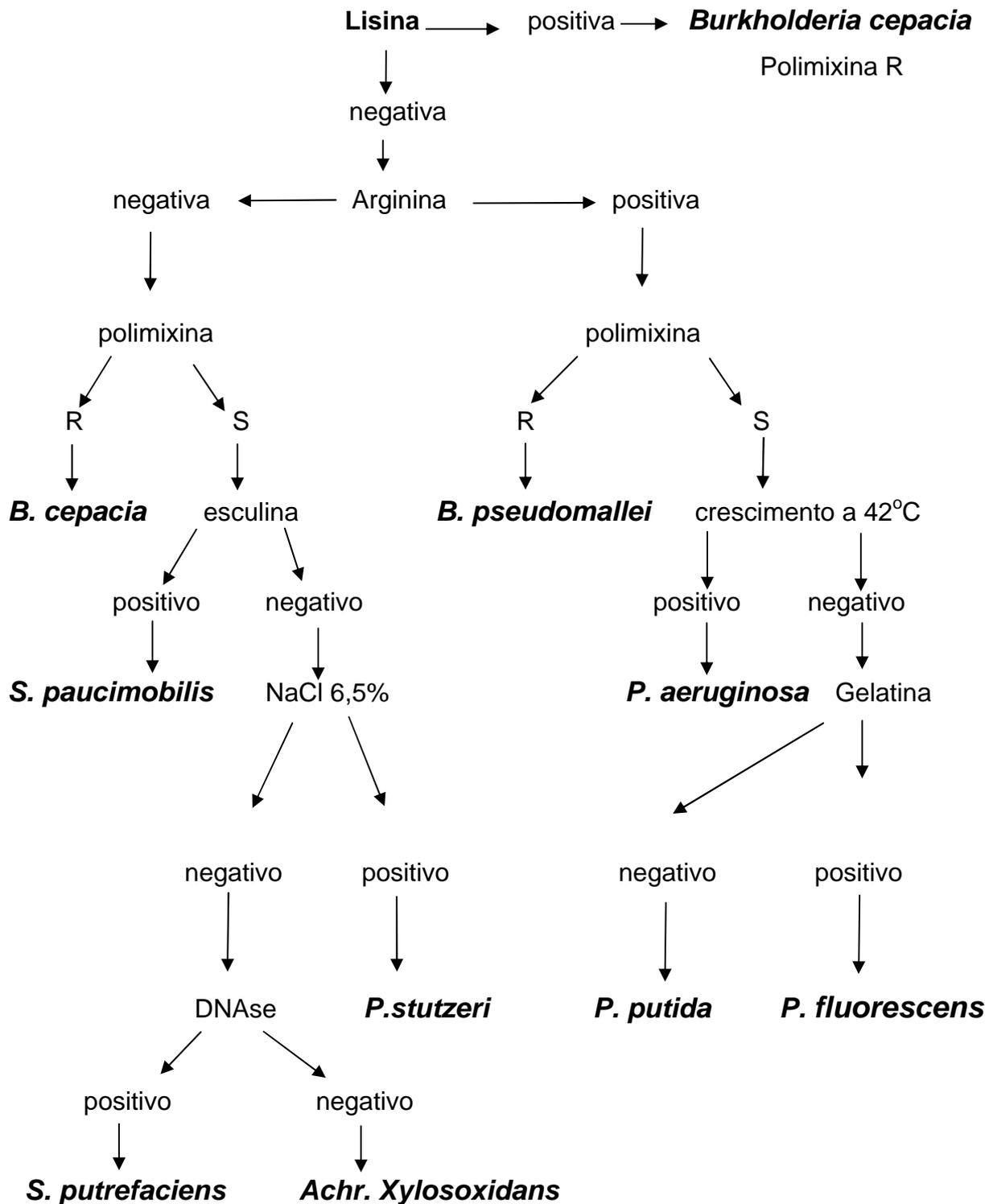


Tabela 3.6 - Bacilos oxidase (+), Motilidade (+) OFG Alcalino - incubar 72h.

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

*raramente pode ser oxidase +

Prova complementar ²

Microrganismos	PYR
<i>A. denitrificans</i>	positivo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	negativo
<i>B. bronchiseptica</i>	negativo
<i>S. malthophilia</i>	negativo

Tabela 3.7- Bacilos e coco-bacilos Gram negativos, Não fermentadores, oxidase positiva, OF glicose variável, com pigmento róseo(1)

Microrganismos	Motil.	Morfo- logia	Urease	Mc Conkey	42°C	Observação
<i>Methylobacterium spp</i>	pos	B	Pos	Neg	neg	colônia seca coral
<i>Roseomonas spp</i>	Var	CB	Pos	Pos	pos	colônias mucóides rosadas

4. TABELA GERAL DE CONSULTA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NÃO FERMENTADORES

Tabela 4.1 - Oxidase e motilidade negativos

Microrganismos	OXI	MOT	M	OF G	42°C	CIT	MALO	GEL	HEM
<i>A. baumannii</i>	Neg	Neg	C	O	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
<i>A. calcoaceticus</i>	Neg	Neg	C	O	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
<i>A. haemolyticus</i>	Neg	Neg	C	I / O	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos
<i>A. Iwoffii</i>	Neg	Neg	C	I	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>Acinetobacter spp</i>	Neg	Neg	C	I / O	Neg	Pos	Var	Var	Var

Tabela 4.2 - Oxidase negativo e motilidade positiva

Microrganismos	OXI	MOT	M	OF g	IMP	ESC	Dnase	LIS	ARG	MC	42oC
<i>P. luteola</i>	Neg	Pos	B	O	S	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	94%+
<i>P. oryzihabitans</i>	Neg	Pos	B	O	S	Neg	Neg	Neg	14%+	Pos	33%+
<i>S. maltophilia</i>	Neg	Pos	B	85%O	R	39%+	Pos	Pos	neg	Pos	48%+
<i>B. cepacia</i>	14%neg	pos	B	O	S	63%+	Neg	80%+	neg	Pos	83%+

Tabela 4.3 - Oxidase positiva e motilidade negativa – OFG oxidativo

Microrganismos	OXI	MOT	M	OF G	URE	IND	Dnase	MC	polimi x
<i>C. meningosepticum</i>	Pos	Neg	B	O lento	neg	Pos	Pos	Var	R
<i>C. indologenes</i>	pos	neg	B	O lento	neg	pos	neg	var	R
<i>S. paucimobilis*</i>	pos	neg37°C	B	O	neg	neg	neg	var	S
<i>Sphingobacterium spp</i>	pos	Neg	B	O	V	neg	V	V	R

* pode ser motilidade positiva a 20°C

Tabela 4.4 - Oxidase positiva, motilidade negativa, OFGlicose inerte e cocóide

Microrganismos	OXI	MOT	Morf	OF G	URE	GEL	Dnase	MC
<i>M. catarrhalis</i>	Pos	Neg	C	I	Neg	Neg	Pos	Neg
<i>M. canis</i>	Pos	Neg	C	I	Neg	Neg	Pos	Pos
<i>M. fenilpiruvica / ureolytica</i>	Pos	Neg	C	I	Pos	Neg	Neg	Pos
<i>M. lacunata</i>	Pos	Neg	C	I	Neg	Pos	Neg	Neg
<i>Moraxella spp*raras</i>	Pos	Neg	C	I	Neg	Neg	Neg	Var

* *Moraxella spp*: *nonliquefaciens*, *lincolni*, *osloensis*, *atlantae* e *Oligella urethralis*

Tabela 4.5 - oxidase positiva, motilidade positiva e OF Glicose inerte ou alcalino

Microrganismos	OXI	MOT	M	OF G	MC	URE	CIT	Nat/lito	Nit/gás	42°C
<i>A. x. denitrificans</i>	Pos	Pos	B	ALC	pos	NT		pos	Pos	
<i>A. piechaudii</i>	pos	pos	B	ALC	Pos	neg		pos	Neg	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Pos	Pos	B	ALC	Pos	Neg		neg	Pos	
<i>B. bronchiseptica</i>	Pos	Pos	CB	ALC	Pos	Pos++		pos	Neg	
<i>Comamonas spp</i>	pos	pos	B	Inerte	pos	neg	Pos	pos	neg	Var
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	pos	pos	B	Inerte	pos	neg	Var	Pos	Neg	Pos
<i>P. alcaligenes</i>	Pos	Pos	B	Inerte	Pos	Neg	var	54+	neg	Neg

Tabela 4.6 - oxidase positiva, motilidade positiva e OF Glicose oxidativo

Microrganismos	OXI	MOT	M	OF G	42°C	GEL	ESC	POL	MC	LIS	Arg
<i>A. x. xiloxidans</i>	Pos	Pos	B	O	NT	NT	Neg	S	Pos	NT	var
<i>P. aeruginosa</i>	Pos	Pos	B	O	Pos	82%+	Neg	S	Pos	Neg	pos
<i>P. fluorescens</i>	Pos	Pos	B	O	Neg	Pos	Neg	S	Pos	Neg	pos
<i>P. mendocina</i> (rara)	Pos	Pos	B	O	Pos	Neg	Neg	S	Pos	Neg	pos
<i>P. putida</i>	Pos	Pos	B	O	Neg	Neg	Neg	S	Pos	Neg	pos
<i>P. stutzeri</i>	Pos	Pos	B	O	69	Neg	Neg	S	Pos	Neg	neg
<i>S. paucimobilis</i>	Pos	Pos	B	O	NT	NT	Pos	S	var	NT	neg
<i>B. cepacia</i>	86%+	Pos	B	O	83%+	20%+	63%+	R	Pos	80%+	neg
<i>B. pseudomallei</i>	pos	pos	B	O	pos	79%+	59%+	R	Pos	neg	Pos
<i>S. putrefaciens</i>	pos	pos	B	O	Var	Var	neg	S	pos	neg	Neg

Tabela 4.7 - Bactérias não fermentadoras com pigmento rosa

Microrganismos	OXI	MOT	M	OF g	URE	MC	42oC	Obs.
<i>Methylobacterium spp</i>	pos	pos	B	Var	pos	neg	neg	Colônia seca coral , bacilos com vacúolos
<i>Roseomonas spp</i>	pos	Var	CB	var	pos	pos	pos	Colônias mucóides rosadas cocobacilos

5. REFERÊNCIAS

1. AUGUST, M.J., HINDLER, J.A., HUBER, T.W., SEWEL, D.L. CUMITECH 3A. **Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology.** Coord. Ed. A.S. Wessfeld. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1990.
2. FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 10th Ed. St.Louis. Mosby Inc., 1998.
3. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M.; SCHRENKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Nonfermentative gram-negative Bacili**, Chapter 5. IN: **Diagnostic Microbiology -- Color Atlas and Textbook.** 5th Ed. Lippincott, 1997.
4. LAFFINEUR, K., JANSSENS, M., CHARLIER, J. et al. Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods. *J. Clin. Microbiol.* **40(3):**1085-1087, 2002.
5. Mc FADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.** 3rd. Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 2000.
6. MURRAY, P. R. et alli. **Manual of Clinical Microbiology.** American Society for Microbiology 7th ed. Washington DC.1999.
7. OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** Sarvier, São Paulo Brasil, 2000. 254p
8. SCHRENKENBERGER, P.C. **Practical approach to the identification of glucose non fermenting Gram-negative bacilli - a guide to identification.** 2nd Ed. University of Illinois, College of Medicine at Chicago. CACMLE, 1996.

Abreviaturas do capítulo de Não fermentadores:

42°C = crescimento a temperatura de 42°C

ALC = reação alcalina no meio OFG

ARG = arginina

B = bacilo

C = coco

CIT = citrato

EPM = meio Escola Paulista de Medicina

GEL= gelatina

HEM= hemólise em agar sangue

H₂S = ácido sulfídrico

I = meio OF Glicose Inerte

IAL= meio Adolfo Lutz

IND= prova de indol

IMP= Imipenem teste com disco de

LIS = lisina

M = morfologia da bactéria(C=coco, B=bacilo e CB=coco-bacilo)

MALO = utilização do malonato

MILi = meio motilidade Indol Lisina

MOT = prova da motilidade em lâmina

NaCl6,5% = crescimento em caldo com NaCl6,5%

Neg = prova negativa

NT = não testado (não citado na literatura)

O = meio OF Glicose oxidativo

OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson

POL = polimixina

Pos = prova positiva

R = resistente

S = sensível

TSI = tríplex açúcar ferro

URE= uréia

VAR = reação variável

Capítulo 6 - BACILOS CURVOS OU ESPIRALADOS

1. 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.

Tabela 1 - Principais Bactérias Curvas ou Espiraladas

Agente	Doença	Reservatório	Transmissão
<i>Arcobacter spp</i>	Bacteremia, gastroenterite	Gado, humanos	Alimentos ¹
<i>Borrelia burgdoferi</i>	Doença de Lime	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 extra-intestinal	Humanos	Fecal-oral
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, úlcera péptica	Humanos, macacos, gatos	Fecal-oral
<i>Helicobacter spp</i>	Gastroenterite, bacteremia, etc.	Animais domésticos	Fecal-oral, alimentos
<i>Leptospira spp</i>	Leptospirose	Cães, gatos, porcos, ratos	Alimentos-água ²
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	Humanos	Sexual
<i>Vibrio spp</i>	Gastroenterite	Alimentos, água	Alimentos ¹

¹ Ingestão de alimentos e água contaminados

² Alimentos ou água contaminados com urina de animal infectado

Tabela 2 - Recursos diagnósticos

Agente	Testes*
<i>Arcobacter spp</i>	<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 Warthin-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 spp</i>	<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 agar sangue a 37°C, mas não a 42°C em ambiente específico de combinação de gases
<i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 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>	<ul style="list-style-type: none"> - Pesquisa no sangue, LCR e urina: microscopia em campo escuro (baixa sensibilidade) ou por imunofluorescência direta - Cultura: 1^{os}. 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 1^a semana da doença. - Sorologia: aglutinação ou ELISA são sensíveis e específicos
<i>Treponema pallidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 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

2. *Campylobacter*

Material: em 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 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.

Tabela 3 - Principais espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter*

Bactéria	Catalase	H2S - TSI	Cresc. 15°C	Cresc. 25°C	Cresc. 42°C	MC	Ac. Nalidixico	Cefalotina
<i>C. jejuni</i>	+	neg	neg	neg	+	+	S ou R	R
<i>C. coli</i>	+	neg	neg	neg	+	+	S	R
<i>C. fetus</i>	+	neg	neg	+	neg	+	S ou R	S
<i>Campylobacter spp</i>	V	+	neg	neg	+	V	S ou R	S*
<i>Arcobacter</i>	+	neg	+	+	V	V	S	V

* *C. lari* = R

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 >0,45µm. 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.

3. *Vibrios, Aeromonas e Plesiomonas*

Como suspeitar da presença de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*? Duas são as principais evidências:

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

Tabela 4- Principais bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva e sua associação com diferentes quadros clínicos:

Bactéria/ Material clínico	Diarréia	Infecções partes moles	Sepse	Outros
<i>Vibrio cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	freqüente	pouco comum	raro	raro
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	freqüente	raro	freqüente *	raro
<i>A. hydrophila</i>	freqüente	frequente	freqüente	freqüente
<i>A. caviae</i>	freqüente	raro	freqüente	freqüente
<i>A. veronii</i>	freqüente	raro	freqüente	freqüente

*associado à meningite em recém-natos

3.1. *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, oxidase positivos. 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, alimentos contaminados) em surtos e epidemias associadas a falta de

condições sanitárias adequadas. O quadro clínico pode variar de assintomático a diarreia 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 Mc 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 positivos, a maioria é esculina negativa, DNase positivo e quase todos crescem em caldo com NaCl 6%.

3. 2. *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* tem 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 negativas, H₂S negativo, fenilalanina negativo, indol positivo, motilidade positiva, e crescem bem em meios ricos e seletivos (Mc Conkey e SS).

Tabela 5 - Principais provas diferenciais entre *Aeromonas spp*, *E.coli* e *Citrobacter spp*

Bactérias/Provas	Citrato	uréia	lisina	H2S	Lactose	Gás
<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	Neg	+	+
<i>Citrobacter spp</i>	+	Var	Neg	Var	Var	+
<i>Aeromonas spp</i>	Var	Neg	+	neg	Neg ¹	Var

¹ *Aeromonas caviae*: lisina negativo e lactose positiva

Tabela 6 - Provas diferenciais para bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva: *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*

Provas	<i>V. cholerae</i>	Outros vibrios	<i>Aeromonas spp</i>	<i>Plesiomonas spp</i>
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*

Tabela 7 - Provas para diferenciar as principais espécies de *Aeromonas* e *Plesiomonas*

Bactéria	Indol	Lis /arg /orn	arabinose	Lactose	sacarose	esculina	hemólise*
<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	Var
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+	+ + +	neg	neg	neg	Neg	neg

* sangue carneiro

4. REFERÊNCIAS

1. MURRAY, P.R. Algorithms for identification of curved and spiral-shaped Gram negative rods. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM, 7th ed. 1999. 712 – 715.
2. NACHAMKIN, I. *Campylobacter and Arcobacter*, in: Murray, P. R. et alli. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology 7th. Ed. 1999, 716-726.

Capítulo 7 - BACILOS GRAM POSITIVOS

1. INTRODUÇÃO:

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

Bactérias consideradas:

a) Corineformes:

Arcanobacterium spp, Corynebacterium spp, G. vaginalis, Oerskovia spp, Rhotia spp

b) Bacilos Gram positivos regulares:

Erisipelotrix spp, Listeria spp, Kurthia spp

c) Esporulados:

Bacillus spp

d) Bacilos ramificados (Actinomycetos):

Nocardia spp, Rhodococcus spp, Streptomyces spp

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

Actinomyces spp (anaeróbios), *Clostridium spp* (anaeróbios), *Lactobacillus spp* (anaeróbios), *Mycobacterium spp* (micobactérias), Outros anaeróbios: *Mobiluncus spp, Propionibacterium spp, Eubacterium, Bifidobacterium spp*. Os *Actinomyces spp* e alguns *Propionibacterium spp* embora anaeróbios, podem ser aerotolerantes, e crescer em aerobiose.

2. ORIENTAÇÃO GERAL NA IDENTIFICAÇÃO DE BGPs:

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

a) Colher material com antissepsia rigorosa para evitar contaminação.

b) 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.

c) Valorizar o achado em pacientes imunocomprometidos

- d) 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.
- e) Valorizar materiais nobres (sangue, LCR, pericárdico, etc.), biópsias, aspirados de abscessos, LBA, etc desde que bacterioscopia e o quadro clínico sejam compatíveis;
- f) Cuidado com contaminação por bactérias da flora de mucosas.
- g) Em caso de abscessos é interessante fazer semeadura quantitativa (com alça calibrada), sendo sugestivo o isolamento de $>10^4$ ufc/mL
- h) Em urina é sugestivo quando isolado como único agente, bacterioscopia concordante, leucocitúria, sintomas de infecção urinária e contagem $>10^5$ ufc/mL.
- i) Observar características da colônia: cor, tamanho, cheiro, consistência, hemólise, etc.
- j) Testar em quais meios cresce o BGP e suas condições de incubação.
- k) Para observar esporos e hifas aéreas algumas vezes é necessário deixar a colônia envelhecer ou crescer em meios pobres.
- l) É sempre interessante semear em meio sólido e em caldo para observar variação morfológica. Observar ramificações em diferentes condições e meios de cultivo
- m) Fazer coloração de Ziehl ou de Kinyoum para pesquisa de álcool-ácido resistentes.
- n) 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.

3. CORINEFORMES

São classificados como corineformes as seguintes bactérias:

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

Tabela 1 - Principais doenças associadas aos bacilos Gram positivos

Bactéria	Quadro clínico
<i>Actinomyces spp</i> , <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 spp</i> , <i>A. nhaemolyticum</i>	faringite, infecção de partes moles, endocardite, etc
<i>Bacillus sp</i> , <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 sp</i>	celulite em veterinários e zona rural
<i>Gardnerella spp</i>	vaginose, endometrite, pós-parto
<i>Lactobacillus spp</i>	flora oro-intestinal e vaginal, raríssimo patógeno
<i>Listeria spp</i>	meningite, sepses, aborto
<i>Nocardia spp</i>	abscesso cerebral, abscesso pulmonar, etc em imunocomprometidos
<i>Oerskovia spp</i>	bacteremia, infecção associada a corpo estranho
<i>Rhodococcus spp</i>	pneumonia, abscessos, etc em imunocomprometidos
<i>Rothia spp</i> , <i>R. dentocariosa</i>	endocardite, bacteremia, infecções respiratórias
<i>Streptomyces spp</i>	Oportunista, infecções de partes moles, etc.

Tabela 2 – Triagem inicial para Bacilos e Cocobacilos Gram positivos

Bactéria	esporo	anaeróbio	AAR*	ramificado	hemólise	catalase	Obs:
<i>Actinomyces spp</i>	neg	+	neg	+	neg	V	
<i>Arcanobacterium spp</i>	+	neg	neg	Raro/curto	beta	neg	pleomórfico
<i>Bacillus spp</i>	+	neg	neg	neg	V	+	
<i>Clostridium spp</i>	neg	+	neg	neg	V	neg	
<i>Corinebacterium spp</i>	neg	neg	neg	neg	neg		paliçada
<i>Erysipelotrix rhustioptathie</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 spp</i>	neg	+	neg	neg	neg	V	
<i>Mobiluncus spp</i>	neg	+	neg	neg	neg	neg	móvel
<i>Listeria spp</i>	neg	neg	neg	neg	beta	+	móvel
<i>Mycobacterium spp</i>	neg	neg	+	V	neg	+	Cresc. lento
<i>Nocardia spp</i>	neg	neg	+	+	neg	+	Col. laranja
<i>Oerskovia spp</i>	neg	neg	neg	V	neg	+	Col. amarela
<i>Ppropionibacterium spp</i>	neg	+	neg	+	neg	V	
<i>Rhodococcus spp</i>	neg	neg	V	V	neg	+	Col. coral
<i>Rhotia dentocariosa</i>	neg	neg	neg	+	neg	+	pleomórfico
<i>Streptomyces spp</i>	neg	neg	neg	+	neg	+	Raro, hifas

* AAR = álcool-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:

3.1. *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 e reação de CAMP.

Principais características: Não se ramificam e não são álcool ácido resistentes. Em geral são catalase positivos, imóveis, esculina e gelatina negativos.

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 melhor visualizados através da coloração de Albert-Laybourn, e que caracterizam as bactérias conhecidas como diferóides. As corinebactérias de maior importância clínica são catalase positivas, imóveis podendo ser fermentadoras ou não.

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

Corinebacterias 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 em trato respiratório e manifestações tóxicas em coração e nervos periféricos.

Quadro clínico: Ocorre dor de garganta, dificuldade de deglutição, presença de pseudomembrana purulenta, dor no corpo, cefaléia, náuseas e febre. A morte pode

ocorrer por obstrução respiratória ou por miocardite. Pode ocorrer difteria cutânea com lesões necróticas e, eventualmente, presença de pseudomembrana.

O laboratório deve processar o material semeando em meios não específicos como ágar sangue e ágar chocolate para pesquisa do *Streptococcus pyogenes* e outros patógenos eventuais, e encaminhar outro swab em meio de transporte para o laboratório de referência. 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.

Coleta de material para diagnóstico da difteria: O material de orofaringe ou nasofaringe deve ser colhido das bordas, abaixo da pseudomembrana purulenta.

Bacterioscopia: 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. 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.

3.2. C. pseudotuberculosis: 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. As colônias são pequenas, branco-amareladas, urease positiva, CAMP reverso positivo (inibe a beta-hemólise do *S. aureus* em ágar sangue com hemácias de carneiro).

Tabela 3 - Provas diferenciais para os corineformes

Bactéria / Prova	Catalase	O/F ¹	Motilidade	Uréia	Esculina	CAMP reverso	Hemólise
<i>Arcanobacterium spp</i>	neg	F	neg	neg	neg	+	beta
<i>C. diptheriae</i>	+	F	neg	neg	neg	neg	neg
<i>C. jeikeium</i>	+	O	neg	neg	neg	neg	neg
<i>C. ulcerans/pseudot. *</i>	+	F	neg	+	neg	+	neg
<i>Corinebacterium spp</i>	+	F	var	var	neg	neg	neg
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Neg	F	neg	neg	neg	neg	Beta ²
<i>Oerskovia spp</i>	+	F	var	neg	+	neg	neg
<i>Rhotia spp</i>	var	F	neg	neg	+	neg	neg

¹ Base CTA (cystine tripticase agar) ² ágar sangue de coelho * *Pseudotuberculosis*
O = oxidativo e F = fermentador

Algumas características importantes de alguns corineformes:

C. jeikeium: colônia pequena cinza ou translúcida, à bacterioscopia é um pequeno cocobacilo gram positivo, resistente a vários antibióticos (beta-lactâmicos, gentamicina, etc). 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.

Apresenta metabolismo oxidativo na base CTA, enquanto a maioria das *Corynebacterium spp* de importância clínica são fermentadoras. Cresce em BHI com 1% de Tween 80, sendo lipofílica e não em caldo BHI sem Tween 80. Oxida a glicose, é uréia negativa, esculina negativa, PYR positiva.

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

Rhotia denticariosa: pertence à microbiota da cavidade oral, e está raramente associada à endocardite. São bacilos Gram positivo retos, sendo alguns ramificados. As colônias são brancas salientes e às vezes rugosas. São fermentadores da glicose e esculina positivo.

3.4. *Arcanobacterium spp* – São bacilos Gram positivos irregulares, catalase negativa, imóveis e fermentadores. Espécies: *A. haemolyticum*, *A. pyogenes* e *A. bernardiae*. São hemolíticos, têm a hemólise melhor visualizada em sangue de coelho, e crescem melhor em CO₂. 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).

Crescem em 24-48h como colônias pequenas e hemolíticas. São bacilos delicados e curvos e alguns apresentam dilatação terminal e ramificações rudimentares. Colônias mais velhas tendem a adquirir a forma de cocobacilo, que pode ser confundido com estreptococos. Em caldo tendem a formar ramificações e em anaerobiose filamentos.

Importância clínica: *Arcanobacterium haemolyticum* tem sido considerado juntamente com *S. pyogenes* 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.

3.5. *Gardnerella spp* – são pequenos bacilos ou cocobacilos irregulares, que se coram irregularmente pela violeta. A principal espécie é a *Gardnerella vaginalis*, que tem uma classificação taxonômica incerta, é para fins didáticos estudada com os coryneformes. 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 negativos. Crescem no ágar sangue humano e de coelho produzindo hemólise beta, mas sem hemólise no agar 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.

Importância clínica: Faz parte da microbiota vaginal de cerca de 70% das mulheres em idade reprodutiva, mas está associada à vaginose bacteriana, quando predominana flora vaginal em substituição ao *Lactobacillus* de Doderlein. A vaginose bacteriana e a presença de *Gardnerella* 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.

3.6. *Oerskovia spp* - São microrganismos cocóides ou na forma de bacilos resultantes da quebra de micélios, apresentam ramificação, hifas vegetativas, sem hifas aéreas e penetração no ágar. Catalase positivo, motilidade variável e fermentadores.

Oerskovia turbata e *O. xanthineolytica*, são bactérias do meio ambiente ou solo, com pouca importância clínica, com raros casos de bacteremia e infecções em implantes de próteses. Cresce bem em ágar sangue de carneiro e no agar chocolate.

Cresce mal no meio de Sabouraud dextrose. O crescimento, quando ocorre, é visível após 24-48h em anaerobiose ou 5% CO₂. Apresentam colônias amareladas, catalase positiva em aerobiose, oxidase negativa. Fermentador da glicose, sacarose e lactose, hidrolisa gelatina, amido e esculina.

4. BACILOS GRAM POSITIVO

4.1. *Listeria* - São bacilos Gram positivos pequenos, uniformes, não ramificados, apresentando-se só ou em pequenas cadeias. A única espécie importante para o homem entre as sete espécies conhecidas é a *L. monocytogenes*. Móvel a temperatura ambiente

(25 a 28°C) e imóvel a 37°C. Crescem em ágar sangue, ágar Chocolate, CLED, ágar nutriente, TSA e agar Mueller Hinton, mas não em Mc 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. É um anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo, que produz ácido de glicose e CAMP positivo. Além disso, é verificada prova da esculina rapidamente positiva, assim como uréia, gelatina, indol e H₂S negativas.

Importância clínica: 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.

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 sepsis neonatal. Pode ocorrer em surtos, em geral relacionados a contaminação de alimentos.

Isolamento: 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.

Identificação: bacilo Gram positivo, hemólise beta em ágar sangue de carneiro, CAMP teste positivo, motilidade positiva à temperatura ambiente, hidrólise da esculina positiva e NaCl 6,5%+.

4.2. Erysipelotrix rhusiopathiae - Bacilo Gram positivo curto, de extremidades arredondadas anaeróbio facultativo, não esporulado, não álcool ácido resistente, ocorre só, 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.

Características clínicas: A lesão costuma ser violácea e com muita dor, acompanhada de edema endurecido, 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: cresce em ágar sangue, ágar chocolate, caldo tripticase soja, a 35°C aerobiose ou 5% de CO₂. No agar 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

Identificação: catalase negativo, imóvel, cresce entre 5 a 42°C e em caldo NaCl 6,5%, esculina negativa, fermenta lentamente a glicose sem produzir gás, uréia e indol negativos, mas caracteriza-se por crescer no TSI produzindo H₂S, é lactose positivo, sacarose negativo.

Tabela 4 - Principais diferenças entre bacilos e cocobacilos Gram positivos

Bactéria/Prova	Gram	Catalase	Motil. 25°C	Hemólise	CAMP test	NaCl 6,5% Esculina	Obs.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilo curto ou cocobacilo regular e largo	+	Móvel	beta	+	+ / +	
<i>Enterococcus spp</i>	Cocos ou cocobacilos em cadeias	neg	neg	alfa beta gama	neg	+ / +	
<i>Streptococcus beta hemolíticos</i>	Cocos em cadeias	neg	neg	beta	Neg *	neg / neg	
<i>Lactobacillus spp</i>	Cocobacilos e cadeias longas	neg	neg	não	neg	neg / neg	
<i>Kurthia spp</i>	Bacilo grande, cadeias, cocóide em cultura velha	+	Móvel	não	neg	neg / neg	Não usa glicose
<i>Corynebacterium spp</i>	Bacilos e cocobacilos pleomórficos	+	Neg	V	neg	V / neg	
<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i>	cocobacilo ou filamentos longos	neg	neg	alfa	neg	neg / neg	H ₂ S+

* Só *S. agalactiae* (beta do grupo B) é positivo

4.3. *Kurthia* - 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. São aeróbios estritos, não esporulados, não álcool ácido resistentes; são móveis, catalase positivo e não fermentadores. Crescem em ágar sangue como colônias de cor creme não hemolíticas, podendo ser confundidas com *Bacillus spp.*

Habitat e importância: vivem no meio ambiente, na água, solo, animais, sua carne e seus derivados. Seu papel clínico é questionado, pois não há relatos recentes de isolamento em casos significativos.

Bacilos Gram positivos anaeróbios que devem ser diferenciados:

- ***Lactobacillus spp*** - Flora da boca, intestino e flora vaginal (Bacilo de Doderlein). São aneróbios estritos mas crescem em ágar sangue e ágar chocolate como colônias muito pequenas. São imóveis e catalase negativa. Sem valor patogênico.
- ***Mobiluncus spp*** - 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.

5 - BACILOS ESPORULADOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS FACULTATIVOS:

5.1. Genero *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*.

Tabela 5 - Principais espécies de Bacillus relacionadas à infecção

Espécie de Bacillus	Quadro clínico	Frequência de relatos
<i>Anthraxis</i>	Anthrax cutâneo	Bastante frequente
	Anthrax intestinal	Raro
	Anthrax pulmonar	Raro
<i>Cereus</i>	Necrose ou gangrena em partes moles	Bastante frequente
	Bacteremia e sepse	frequente
	Intoxicação alimentar	Muito frequente
	Infecções pulmonares, endocardite, meningite, osteomielite e endoftalmite	frequente
<i>Circulans</i>	Infecções de partes moles, abscessos bacteremia e sepse	frequente
<i>Licheniformis</i>	Bacteremia e sepse	Pouco frequente
	Intoxicação alimentar	frequente
<i>Subtilis</i>	Intoxicação alimentar	Muito frequente
	Bacteremia, sepse, endocardite e infecções respiratórias	raro

5.2. *Bacillus cereus* - pode apresentar dois tipos de intoxicação:

- caracterizado por diarreia, dor abdominal, que aparecem 8 a 16h 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.

5.3. *Bacillus anthracis* - o 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 em guerra 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. Chama atenção que a 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: em casos clínicos os *Bacillus* estão na forma vegetativa, mas em alimentos, produtos secos de animais(ossos, crina,pelo) o *Bacillus* deverá estar em forma esporulada e haverá necessidade de ativá-los a 62,5°C por 15 minutos (choque térmico). Os *Bacillus* 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.

Tabela 6 - Diferenças entre *Bacillus spp* e *Clostridium spp*

<i>Bacillus spp</i>	Endosporos em aerobiose	Catalase positivos
<i>Clostridium spp</i>	Endosporos em anaerobiose	Catalase negativos

Tabela 7 - Diferenças entre *B. cereus*, *B. anthracis* e espécies relacionadas

Espécies	Col. no ágar sangue	Motilidade	Hemólise	Penicilina	Citrato	Lecitinase
<i>B. cereus</i>	Esverdeado claro	+	+	Res	+	+
<i>B. anthracis</i>	Branco acinzentado	neg	neg	Sem	var	Fraco +
<i>B. thurigiensis</i>	Esverdeado claro	+	+	Res	var	+
<i>B. cereus subsp. mycoides</i>	Rizoides / espalhando	neg	Fraco +	Res	+	+

* agar 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.

6. 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) a origem do material, valorizando os abscessos,
- b) a quantidade de microrganismos isolados e correlação com a bacterioscopia do material
- c) possibilidade de contaminação com bactérias da mucosa oral,
- d) pigmento da colônia,
- e) análise morfológica da bactéria pelo microcultivo em lâmina idêntico ao utilizado na secção de Micologia, empregando ágar fubá sem dextrose a 25oC.

Tabela 5 - 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

6.1. *Nocardia spp* - 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 *N. asteroides* e *N. brasiliensis*.

Importância - 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 - Quando colhido o material por punção, biópsia ou mesmo swab da lesão profunda, ele deve ser processado rapidamente e existe uma característica do material descrita como grânulos de enxofre, especialmente nos micetomas.

Bacterioscopia e Histologia - 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.

Isolamento e Identificação - Não é bactéria exigente, crescendo em ágar sangue, ágar chocolate, ágar Sabouraud dextrose, ágar seletivo para *Legionella* e Lowenstein Jensen. Cresce entre 72h a 14 dias. Com exceção da *N. asteroides*, a maioria das nocardias apresentam beta-hemólise em ágar sangue de carneiro. Crescem em meio de parafina (como fonte única de carbono), juntamente com *Rhodococcus* e algumas micobactérias.

Em microcultivo é possível visualizar as hifas ramificando-se em angulo 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 angulo agudo e sem ramificações secundárias.

Uma característica importante é a cor das colônias em Sabourad dextrose ágar ou mesmo em outros meios:

- salmão ou laranja claro – *N. asteroides*
- laranja escuro – *N. brasiliensis*

A *Nocardia brasiliensis* é uréia positivo, citrato positivo e gelatina positiva.

A *Nocardia asteroides* é uréia positivo, citrato variável e gelatina negativa.

6.2. *Rhodococcus spp* - Importância das nove espécies conhecidas. O *R. equi* 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.

Diagnóstico clínico diferencial deve ser feito com micobactérias, fungos, nocardia e actinomyces. Hemoculturas com elevada freqüência podem ser positivas.

Material para diagnóstico: Lavado bronco-alveolar (LBA), biópsias, hemocultura e mesmo escarro. Em material clínico o *Rhodococcus* 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.

Identificação - Em microcultivo o *R. equi* cresce de forma típica como cocobacilo 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.

A coloração pelo Ziehl ou Kinyoun pode revelar a fraca álcool-ácido resistência. 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.

6.3. *Streptomyces spp*

Alguns milhares de espécies de *Streptomyces* já foram caracterizados, sendo na quase totalidade saprófitas. O *Streptomyces somaliensis* é responsável pelo micetoma de cabeça e pescoço. Outras espécies foram identificadas em casos de pericardite crônica e infecções de partes moles pós-traumáticas (*S. griseus*).

Caracterização: O abscesso pode revelar a presença de grânulos duros. O Gram vai revelar uma massa de bacilos Gram positivo finos. 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 como contas de colar). 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.

7. REFERÊNCIAS:

1. Mc NEIL, M.M., BROWN, J.M. Actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin. Microbiol. Rev. **7(3)**: 357- 417, 1994.

Capítulo 8 - FASTIDIOSOS

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FASTIDIOSOS

Este grupo heterogêneo de bactérias apresenta como característica comum exigências especiais de condições de cultivo, em relação às enterobactérias e a maioria dos não fermentadores. Estas condições variam para cada microrganismo, podendo ser necessidade de CO₂, crescimento lento podendo necessitar 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 MacConkey.
- para teste de fermentação de carboidratos exigem uma base mais rica como o CTA (vide 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 bioquímicas.
- 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, líquidos 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 MacConkey e é oxidase positivo.
- 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** e **Grupo B**

Quadro 1 - 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 spp</i>	Gatos. Humanos com a doença. Outros desconhecidos.	Mordida ou arranhão de gato Picada de piolho infectado
<i>Brucella spp</i>	Mamíferos domésticos	Leite e derivados, carne , sangue secreções de animais doentes
<i>Francisella spp</i>	Animais silvestres	Picada de carrapato ou mosquito infectado em zona endêmica
<i>Haemophilus spp</i>	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Legionella spp</i>	Meio ambiente/água	Inalação de água contaminada
<i>Pasteurella spp</i>	Animais domésticos/selvagens	Mordida e secreções de animais domésticos e selvagens

Tabela 1- Principais provas diferenciais entre os fastidiosos

Bactérias / Provas	Oxidase	catalase	Motil.	AS	ACH
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	neg/+*	pos	neg	pos	pos
<i>Bartonella spp</i>	neg	neg	var	pos	pos
<i>Bordetella pertussis</i>	pos	var	neg	neg	neg
<i>Brucella spp</i>	pos	pos	neg	pos	pos
<i>Capnocytophaga spp</i>	neg	neg	neg	pos	pos
<i>Cardiobacterium hominis</i>	pos	neg	neg	pos	pos
<i>Chromobacterium spp</i>	var	pos	pos	pos	pos
<i>Eikenella corrodens</i>	pos	neg	neg	pos	pos
<i>Francisella tularensis</i>	neg	pos f	neg	neg	pos
<i>Haemophilus influenzae</i>	pos f*	pos	neg	neg	pos
<i>Kingella spp</i>	pos	neg	neg	pos	pos
<i>Legionella spp</i>	pos f	pos f	pos f	neg	neg
<i>Pasteurella spp</i>	pos	pos	neg	pos	pos
<i>Streptobacillus spp</i>	neg	neg	neg		

pos f* = positivo fraco pos = positivo neg = negativo var = variável AS = A. sangue ACH = A. chocolate

Tabela 2 - Principais fastidiosos, material clínico para diagnóstico, meio específico para isolamento e tempo para crescimento da colônia

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 15d
<i>Brucella spp</i>	Sangue/aspirado de medula	Rotina de hemocultura ou meio de Castañeda	Até 30d
<i>Francisella spp</i>	Gânglios, biópsias	Ágar chocolate enriquecido	7 dias
<i>Haemophilus spp</i>	Sangue, LCR, etc.	Ágar chocolate de cavalo	48-72h até 7 d
<i>Legionella spp</i>	Secreções ou aspirados de trato respiratório inferior	Meio específico BCYE*	7 a 14 d
<i>Pasteurella spp</i>	Sangue, LCR, lesões	Ágar sangue, Ágar chocolate	24 a 72h

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

2. *Bartonella*

A classificação taxonômica dos membros do genero *Bartonella* ainda não é definitiva e agrupa as espécies *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *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 1/3 dos pacientes apresentam febre e em 1/6 ocorre supuração do gânglio, sendo que a maioria evolui sem outros sintomas. A cura espontanea ocorre entre 2 a 4 meses.

B. quintanae *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.

2.1. Isolamento - 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. Quando há suspeita clinica, 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 agar chocolate.

No Bactec® pode crescer mas não aciona o alarme de CO₂. Exigem umidade a 35-37°C por 3 a 4 semanas. *B. bacilliformis* e *Afipia fellis* crescem melhor entre 25 a 30°C.

2.2. Identificação - Colônias podem crescer rugosas ou lisas, de um mesmo material. São bacilos Gram negativos pequenos, as vezes curvos. As espécies *quintana* e *henselae*, 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 que é longo (> que sete dias) e a *B henselae* é bem aderente ao meio.

Tabela 3 - Provas para diferenciação de espécies de *Bartonella* e de *A.felis*

Prova	<i>bacilliformis</i>	<i>quintanae</i>	<i>henselae</i>	<i>elizabetae</i>	<i>A. felis</i>
Catalase	+	neg		neg	
Oxidase	neg		neg	neg	+
Uréia	neg	neg	neg	neg	+
Flagelo	+	neg	neg	neg	+
motilidade	+	+ *	+ *	neg	+

Motilidade por fímbrias

3. *Bordetella*

O genero *Bordetella* compreende as espécies *B. pertussis*, responsável pela coqueluche ou tosse comprida, *B. parapertussis*, com quadro clínico semelhante a coqueluche, mas em geral menos severo. Ambas são patógenos exclusivos dos humanos. A *B. bronchiseptica* e *B. avium* são bactérias comensais de mamíferos e aves, causando a primeira infecções em cães (tosse dos canis) e a *B. avium* rinotraqueíte em perus. São patógenos oportunistas para humanos que entram em contato com estes animais. Foram classificadas mais recentemente para o Genero *Bordetella* as espécies *holmesii* e *hinzii*.

3.1. Identificação - as *Bordetellas* são, cocobacilos Gram negativos pequenos e aeróbios estritos. A safranina deve ser corada pelo Gram durante 2 minutos para melhorar a

coloração. Para *B. pertussis* e *parapertussis* os Laboratórios de Referência devem dispor de identificação sorológica para acelerar a identificação.

3.2. Clínica da coqueluche - A *Bordetella pertussis* causa a coqueluche em crianças não vacinadas, com clínica bastante característica: Período prodrômico, que inicia 5 a 10 dias após a aquisição do agente, com sintomas semelhantes a um resfriado ou gripe. Fase altamente contagiosa e com sintomas inespecíficos. Segue-se o período paroxístico com quadro de tosse convulsiva, persistente e característica seguida de inspiração ruidosa. Podem ser acompanhadas de cianose e vômito e várias complicações como convulsões, insuficiência respiratória, encefalopatia, infecções secundárias, etc. A convalescença ocorre cerca de quatro semanas após início dos primeiros sintomas.

Tabela 4 - Provas diferenciais para espécies de *Bordetella*

Provas/espécies	<i>pertussis</i>	<i>para pertussis</i>	<i>bronchiseptica</i>	<i>avium</i>	<i>holmesii</i>	<i>hinzii</i>
Oxidase	+	neg	+	+	neg	+
Motilidade	neg	neg	+	+	neg	+
Uréia	neg	+ em 24horas	+ em 4horas	neg	neg	v
Crescimento em AS e ACH	neg	+	+	+	+	+
Cresc em B&G ou Regan-Lowe	+ 3-6d	+ 2-3d	+ 1-2d	+1-2d	+1-2d	+1-2d
Crescimento em SS	neg	neg	+	+	+	+

B. pertussis necessita de meio específico: Bordet&Gengou (infusão de batata + glicerol + sangue de carneiro) ou Regan Lowe. * mais evidente a 25°C AS = agar sangue ACH = agar chocolate

3.3. Material clínico / Semeadura e identificação - São adequados o swab ou aspirado de nasofaringe e semeadura imediata em meios específicos e em ágar sangue para afastar *B. pertussis*. 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.

4. 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.

Está associado à ingestão de leite e derivados e carne de mamíferos, de modo que veterinários, açougueiros ou trabalhadores rurais que manipulam carne e sangue destes animais e acidentes em laboratórios. A hemocultura exige tempo superior a rotina de 5-7 dias de incubação. É importante a informação médica de suspeita clínica para orientar o laboratório na pesquisa e caracterização do agente.

4.1. Materiais clínicos - 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:

- a) Colher 5 a 10mL de sangue em tubo de 50mL com 1,5mL de citrato de sódio a 4%
- b) Adicionar cerca de 40mL de água destilada estéril
- c) Centrifugar 2.000g por 30 minutos
- d) 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).

4.2. Isolamento e Identificação - As brucellas crescem bem em ágar sangue, ágar chocolate, Trypticase Soy Agar e *Brucella* agar. O crescimento é visível com 48 a 72 horas. Colônias são pequenas, brancas a creme, e ao Gram visualiza-se cocobacilos bem finos e pequenos.

São aeróbio – 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 (+) = *B. abortus* e de *B. suis* (biotipo 1)
- Necessidade de CO₂ para crescimento: biotipos de *B. abortus* e *B. ovis*

Tabela 5- Provas diferenciais entre cocobacilos Gram negativos

Teste/ Bactéria	<i>Brucella</i> spp	<i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Moraxella</i> <i>phenylpyruvica</i>	<i>Pasteurella</i> spp*	<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i>
Oxidase	+	+	neg	+	+	+
Motilidade	neg	+	neg	neg	neg	neg
Uréia	+	+	Var	+	Var	var
Crescimento em AS	+	+	+	+	+	neg
MC	neg	Neg	+	+	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 cocobacilos finos pouco corados, oxidase e catalase positivos, que crescem lentamente em ágar sangue ou chocolate. Soroaglutinação é útil como elemento da caracterização.

5. *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 e nos Estados Unidos prevalece o biovar A que é mais grave. No hemisfério sul prevalece o biovar B que apresenta forma clínica mais leve, sendo pouco diagnosticada principalmente por desconhecimento do agente.

5.1. Fontes e transmissão direta - Centenas de animais selvagens e 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.

5.2. Quadro clínico - 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.

Logo após a penetração do agente, em geral pela pele, aparecem sintomas semelhantes a 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 freqüentes 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.

A forma ulcero-ganglionar ocorre em cerca de 80% dos casos relatados. A úlcera é endurecida, eritematosa, que não cicatriza. Outras formas relatadas são oculoganglionar, em orofaringe, ganglionar sem úlcera,, pleuropulmonar e gastrointestinal.

5.3. Material para isolamento - Os materiais que oferecem maior chance de positividade são a partir de raspados de úlceras, biopsias e escarro. A *Francisella* cresce em agar chocolate suplementado com Isovitalex®. Laboratório de Referência deve ser consultado sobre recursos disponíveis ou encaminhamento de cepas suspeitas.

5.4. Diagnóstico microbiológico - A bacterioscopia de material clínico de lesões ou biópsias raramente ajuda, pois o microrganismo é muito pequeno e cora-se 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.

6. *Haemophilus*

6.1. Importância clínica - Diferentes espécies pertencentes ao genero *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* papel patogênico é fundamental associar à clínica .

Várias são as infecções causadas por *H. influenzae*, sendo por *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, 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 (2ª causa depois do pneumococo), Sinusite.

6.2. *Haemophilus aphrophilus* - Importância clínica – 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. Não necessariamente a endocardite está relacionada à lesão valvular prévia, mas a associação com embolia arterial é freqüente nestes casos. Existem relatos também de isolamento em otites, sinusites e epiglotites, etc.

6.3. *Haemophilus ducrey* - é o agente do cancro mole, sendo na atualidade raramente isolado, pela menor incidência da doença, contaminação das lesões com flora genital e 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. À bacterioscopia aparecem cocobacilos Gram lábeis agrupados e cadeias como cardumes.

Identificação de espécies de *Haemophilus*:

- Anaeróbio facultativo
- Não crescem no TSI e no OF-Glicose
- O 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 haemófilos 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 meios de cultura).
- As provas para caracterização dos hemófilos são:

Tabela 6 - Principais provas para diferenciar algumas espécies de *Haemophilus*

<i>Haemophylus</i>	Exige fator X	Exige fator V	hemólise	uréia	Indol	Glic	Sac	Lac	catalase
<i>influenzae</i>	+	+	neg	Var	var	neg	neg	neg	+
<i>haemolyticus</i>	+	+	+	+	var	+	neg	neg	+
<i>parainfluenzae</i>	neg	+	neg	var	var	+	+	neg	var
<i>ducrey</i>	+	neg	fraca	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<i>aphrophilus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	+	+	+	neg

Obs.: vide leitura de fatores X e V Glic = glicose Sac = sacarose Lac = lactose Var = variável neg = negativo

- Verificar hemólise em ágar sangue de cavalo
- Fermentação de açúcares com base CTA e 1% de açúcar adicionado de fator X e V (vide meios de cultura)

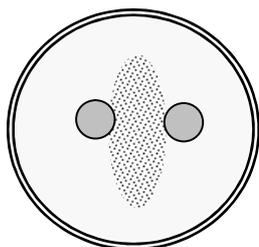
Técnica para testar fatores X e V:

- usar meio agar tripticase soja ou BHI agar
- discos comerciais impregnados com os fatores X=hemina/hematina e V=NAD ou coenzima I.

c) semear a bactéria como se fosse fazer um antibiograma e colocar os discos com pinça a uma distância de 1,5cm um disco do outro. Flambar a pinça antes e após a retirada de cada disco.

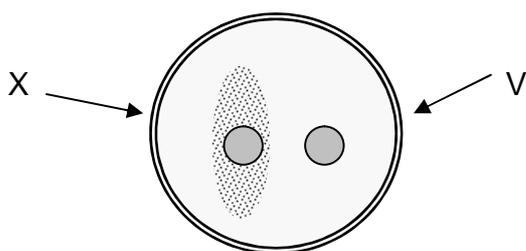
d) após 24h de incubação em jarra com vela e umidade a 35°C, verificar crescimento próximo aos discos:

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



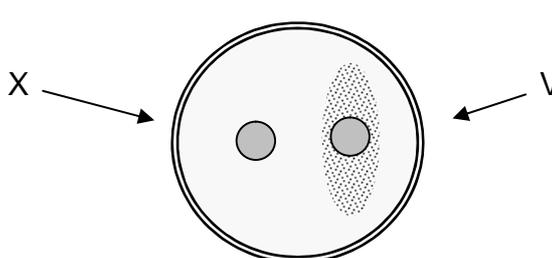
Haemophilus parainfluenzae

Exige fator X



Haemophilus ducrey

Exige fator V



Isolamento - No isolamento primário no agar chocolate as colônias costumam ser pequenas de cor bege claro, com odor característico. No agar 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.

Prova do satelitismo: Técnica - 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.

6.4 *H. aphrophilus* - 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

7. Legionella :

7.1. 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. Esta 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 associado à doença clínica.

7.2. 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. Sintomas: febre, mal-estar, mialgia e tosse. A pneumonia é a forma mais freqüente 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 comprometimento dos mais variados órgãos e tecidos já foram descritos.

7.3. Recursos diagnósticos mais utilizados - cultura, Imuno-fluorescência e aglutinação pelo látex.

a) Cultura - 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 CO₂. 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.

b) 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

c) meio diferencial BCYE - adicionado de glicina, vancomicina, púrpura de bromocresol; e azul de bromotimol. Apresenta as seguintes características: *L. pneumophila* (branco esverdeado), *L. micdadei* (colônias azul claro ou acinzentadas), Outras legionelas (colônias verde bem claro). Crescem bem no frasco utilizado pelo BACTEC®.

d) Materiais recomendados:

- Escarro
- Aspirado traqueal e outros que neste caso específico estão indicados como úteis
- Lavado/escovado brocoalveolar
- 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.

7.4. 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, e a *Legionella* não deverá crescer.
- Aguardar 14 dias para descartar as culturas quando negativas.

Tabela 7- Sensibilidade e especificidade de recursos diagnósticos para legionelose

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

7.5. Características da *L. pneumophila* - oxidase positiva fraca, catalase positiva, não sacarolítico (Não oxida nem fermenta os açúcares), motilidade (+), gelatinase (+) e hidrólise do hipurato (+). 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

8. *Pasteurella*

A infecção pela *Pasteurella* constitui uma zoonose, pois trata-se 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 respectivos animais 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. Caracterizam-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.

8.1. Diagnóstico de zoonoses - 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.

Tabela 8 - 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, sepse 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

8.2. Caracterização microbiológica:

- Cocobacilo 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 (neg)
- Indol(+)
- Sacarose(+)
- Muitas espécies são ornitina positivas

Tabela 9 - Provas diferenciais das espécies mais importantes de *Pasteurella*:

<i>Pasteurella spp</i> de importancia clínica						
Espécie / Teste	hemólise	M Conkey	Indol	Uréia	Ornitina	OF Glicose
<i>multocida</i>	neg	neg	+	neg	+	F sem gás
<i>pneumotropica</i>	neg	var	+	+	+	F gás var
<i>haemolitica</i>	pos ¹	var	neg	neg	var	F sem gás
<i>aerogenes</i>	neg	+	neg	+	var	F sem gás
<i>dagmatis</i>	neg	neg	+	+	+	F com gás

Todas são oxidase +, catalase +, fermentadoras da glicose Obs: 1 = 72%

A *P. multocida* cresce bem em ágar sangue de carneiro e ágar chocolate, formando pequenas colônias acinzentadas. Não cresce em ágar Mc 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 freqüentes podem estar envolvidas.

Quadro 2- Grupo B (casos clínicos esporádicos / microbiota oral humana)

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

GRUPO B DE FASTIDIOSOS - As características deste grupo heterogeneo são:

- dificuldade ou ausência de crescimento em meios ricos como AS e A. 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 generos *Actinobacillus*, *Capnocytophaga* e *Eikenella* tem em comum o fato de pertencerem à microbiota da cavidade oral humana e estarem relacionados a 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.

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

9.1. Caracterização - São cocobacilos 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 branco acinzentadas, com um pregueamento no centro, fortemente aderentes ao meio e pegajosas no primo isolamento.

Tabela 10 - 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>	Fusiforme e curvo, colônias crescem espalhadas
<i>Streptobacillus</i>	Filamentos longos
<i>Chromobacterium</i>	Pode ter forte pigmento violeta, cresce em Mc Conkey

Tabela 11 - Provas diferenciais entre os principais fastidiosos

Testes / Bactérias	<i>Actinobacillus</i> ¹	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Eikenella</i>	<i>Kingella</i>	<i>Cardiobacterium</i>	<i>Streptobacillus</i>	<i>Chromobacterium</i>
Oxidase	neg ou +f	neg *	+	+	+	neg	var
Catalase	+	neg *	neg	neg	neg	neg	+
CO ₂	+	+	+	+	+	+	neg
MC	var	neg	neg	neg	neg	neg	+
uréia	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Indol	neg	neg	neg	neg	+	neg	neg
Glicose	+	+	neg	+	+	+	+
TSI	ac / ac	n cresc.**	alcalino	alcalino	ac / ac	n cresce	alc / ac
motilidade	neg	neg	neg	neg	neg	neg	+

+ ou - = 80% ou mais das provas positivas ou negativas ac = ácido alc = alcalino

¹ *A. actinomycetemcomitans*

* Origem humana. As de origem animal são oxidase e catalase positivas.

** Pode acidificar lentamente var = variável + = positivo neg = negativo

10. *Capnocytophaga*

As espécies de *Capnocytophaga gingivalis*, *granulosa*, *haemolitica*, *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 dental supragengival 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.

10.1. 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 cocoide. Para cultivo, crescem melhor com 5 a 10% de CO₂ e em anaerobiose, o que pode confundir com o anaeróbio estrito, se não for feita 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 72hs, 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, a espécie *ochracea* tem cheiro de amêndoas.

10.2. Identificação - as *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 negativos. A maioria é esculina positivo (*gingivalis* é variável e *granulosa* negativo). A diferenciação das espécies é difícil. As amostras de origem animal (*C. canimorsus* e *cynodegmi*) são oxidase, catalase e arginina positivos).

11. *Eikenella*

Também é bactéria da microbiota da cavidade oral humana e atribui-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 pleuro-pulmonares, infecções pós-cirúrgicas de parede, artrite, meningite, endocardite e septicemia.

11.1. Cultivo, Bacterioscopia e Identificação - É anaeróbio facultativo, mas cresce melhor com 5% de CO₂, em ágar sangue e chocolate, mas não em Mc 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 e origem do nome. Produz um pigmento amarelo claro e tem odor de hipoclorito no ágar sangue e agar chocolate.

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

12. *Kingella*

Especies 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.

12.1. Cultivo, Bacterioscopia e Identificação - A *K. kingae* cresce em ágar sangue e ágar chocolate com 5% de CO₂, após pelo menos 48h de incubação, mas não em Mc 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, colônias espalhadas como se fossem móveis.

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

Tabela 12 - Provas diferenciais entre os fastidiosos oxidase positivos e catalase negativos

Fastidiosos oxidase positivos, catalase, uréia e esculina negativos			
Provas / Bactérias	<i>C. hominis</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>K. kingae</i>
Hemólise	neg	neg	pos
Indol	pos	neg	neg
Ornitina	neg	pos	neg
Glicose	pos	neg	pos

13. *Cardiobacterium hominis*

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

13.1. 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 ágar sangue e ágar chocolate mas não em Mc Conkey, em 3 a 5 dias em 5 a 7% de CO₂. As colônias são branco-amareladas e podem manifestar um pequeno espriamento da colônia simulando motilidade no agar 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 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 48h e extração com xilol e uso do reagente de Ehrlich.

14. *Chromobacterium violaceum*

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

14.1. Bacterioscopia e Cultivo - Bacilo Gram negativo anaeróbio facultativo, reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondadas, isolados ou em arranjos aos pares ou cadeias curtas. Diferente da maioria dos fastidiosos, cresce além do ágar sangue e chocolate, também em Mc Conkey. Característica colônia convexa, lisa e de cor violeta forte, embora algumas variantes sem cor possam ocorrer. Algumas cepas podem ser levemente hemolíticas no ágar sangue.

15. *Streptobacillus moniliformis*

Encontrado na nasofaringe e orofaringe de ratos, camundongos e outros roedores domésticos como a cobaia e as infecções estão relacionadas a mordida destes roedores ou ingestão de leite ou alimentos contaminados. A febre por mordedura do rato apresenta clínica bem definida 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 erupções maculopapulares podendo ser pustulosa, com petéquias ou púrpuras ocorrer 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 e a mortalidade chega a 10%.

15.1. Bacterioscopia e Isolamento - É um bacilo Gram negativo muito pleomórfico, podendo ter em culturas mais velhas de 1 a 150µm de comprimento (habitualmente bactérias tem de 1 a 3µm), com eventuais dilatações como um colar de pérolas, sem apresentar ramificações, quebrando em formas cocobacilares. 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.

15.2. 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 1-2mm 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 pelo.

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. Acidifica lentamente a glicose em base CTA com 0,5% de soro de cavalo.

Capítulo 9 - BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS

1. INTRODUÇÃO

Existe um grupo de bactérias, que produzem 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 diferenciar 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 pode-se citar as seguintes:

- o 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
- o oxigênio altera enzimas bacterianas importantes no metabolismo (oxida, por exemplo, enzimas que contém SH);
- as bactérias anaeróbias estritas não possuem a enzima superóxido dismutase, capaz de transformar o radical O_2^- 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, eram diagnosticadas com maior frequência as infecções provocadas pelos microorganismos mais resistentes dentro deste grupo, os esporulados do gênero *Clostridium*. 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.

2. FATORES PREDISPONENTES

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 freqüentes os seguintes:

- Diminuição do fluxo sangüíneo.
- 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.

3. PROCESSAMENTO DOS MATERIAIS PARA ISOLAMENTO DE ANAERÓBIOS

3.1. 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 vaginal, fezes ou material de colostomia, pois estes materiais sempre têm bactérias anaeróbias. Idealmente, as bactérias anaeróbias estritas são pesquisadas em líquidos aspirados de cavidade 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.

3.2. Transporte do material ao laboratório - 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-se 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 do 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).

3.3. Processamento do material no laboratório - 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.

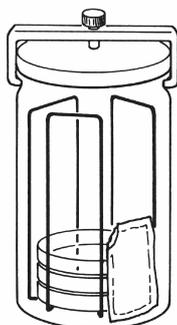
Quando o material vem numa seringa, a semeadura é feita em tioglicolato e em placa. Quando o material já vem no meio de tioglicolato, é feita, a partir deste, a semeadura em placa, e incubados ambos os meios.

3.4. 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 só 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 colocada também 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-se 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 mais ou menos 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 três métodos citados acima dão resultados semelhantes quanto à eficácia do isolamento de bactérias anaeróbias em amostras clínicas, porém, o sistema das jarras é mais prático e menos complicado.

3.5. Semeadura em placa - As amostras são semeadas em três placas de ágar sangue preparadas com *Brucella* ágar 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 CO₂ para bactérias microaerófilas. Para este fim colocamos a placa em uma jarra com um gerador de CO₂, produzindo aproximadamente 5% de CO₂.

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 acrescentamos 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 são sensíveis. 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 outra parte, bactérias de crescimento mais lento, como os actinomices, podem demorar sete dias ou mais para formar colônias visíveis.

3.6. 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.

Com 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, semea-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 só crescer na placa de anaerobiose. O Gram das colônias já orienta

para uma identificação preliminar do grupo de anaeróbio isolado, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - 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	- <i>Veillonella</i> - <i>Acidaminococcus</i> - <i>Megasphaera</i>
Bacilos Gram positivos não esporulados	- <i>Propionibacterium</i> ; - <i>Bifidobacterium</i> - <i>Actinomyces</i> ; - <i>Eubacterium</i> - <i>Lactobacillus</i>
Bacilos Gram positivos esporulados	- <i>Clostridium</i>
Bacilos Gram negativos	- <i>Bacteróides</i> ; - <i>Fusobacterium</i> - <i>Prevotella</i> ; - <i>Porphyromonas</i>

3.7. 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 e formação de ácidos, (detectados por cromatografia líquida), inoculação experimental e 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, recomendamos o tratamento com álcool etílico a 95%, durante 1 hora à temperatura ambiente e ressemeadura posterior. Ale disso, a suspensão bacteriana pode ser aquecida a 80° 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* de acordo com a tabela 2.

Frente aos discos de antibióticos, a bactéria é considerada sensível se o halo de inibição é de 12 mm ou maior. É considerada resistente com halos menores de 12 mm. Como inóculo para a semeadura, é utilizada 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 (\pm 360 nm de comprimento de onda). Colônias de *Prevotella melaninogenica* 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.

Tabela 2- Diagnóstico presuntivo é feito de acordo à seguinte tabela:

Bacilos Gram negativos anaeróbios estritos					
Bactérias / Testes	Rifampicin a 15 mcg	Kanamycin a 1.000 mcg	Bile 20%	Indol	Pigmento
<i>Bacteroides grupo fragilis</i>	S	R	+	\pm	-
<i>Prevotella sp.</i>	S	R	-	\pm	+
<i>Porphyromonas sp</i>	S	R	-	+	+
<i>Bacteróides sp</i>	S	S-R	-	-	-
<i>F.mortiferum</i>	R	S	+	-	-
<i>F.varium</i>	R	S	+	+	-
<i>Fusobacterium spp.</i>	S	S	-	+	-

Para Rifampicina e Kanamicina: S= halo de inibição com 12 mm ou mais de diâmetro
R= 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 frequentemente 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.

3.8. 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*.

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).

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 amoxicilina-ácido 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.

4. REFERÊNCIAS

1. FORBES B.A., SAHM D.F., WEISSFELD A.S. Bailey and Scott's **Diagnostic Microbiology**. 10th ed. Mosby, 1998.
2. ISENBERG H.D. **Clinical Microbiology Procedures** . Handbook. ASM, Washington, DC. 1992.
3. KONEMAN, W.E., ALLEN, D.S., JANDA, M.W., SCHRECKENBERGER, C.P., WINN JR, C.W. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th ed. Lippincott, 1997
4. MURRAY, R.P., BARON, J.E., PFALLER, A., M., TENOVER, C.F., YOLKEN, H.R. **Manual of Clinical Microbiology**, 7th. Ed. ASM Press, Washington, DC. 1999.
5. NCCLS: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, Vol 17 no 22, Villanova PA, National Committee for Clinical Laboratories Standards, 1997.

Capítulo 10 - Interpretação de Resultados e Relatórios Microbiológicos

1. 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.

A requisição do exame constitui um formulário padronizado que, na maioria dos casos, é o único contato entre o clínico e o laboratório e, desse modo, deve fornecer informações suficientes para um processamento adequado da amostra.

Cabe ao microbiologista padronizar um impresso de solicitação de exames microbiológicos que dê a oportunidade ao médico de informar no mínimo:

- idade, sexo, se o paciente é internado ou ambulatorial;
- condições co-mórbidas: gravidez, imunossupressão, diabetes, etc.
- destacar informações clínicas e impressão diagnóstica que são fundamentais para a análise microbiológica como por exemplo:

Urina – paciente sintomático ou não

Fezes – diarreia hemorrágica

Sangue – endocardite, sepse, etc.

Escarro – tuberculose, micose pulmonar

Lesão de pele – mordida de animal ou piodermite ou infecção cirúrgica, etc.

2. O RELATÓRIO (LAUDO) MICROBIOLÓGICO

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 enfermagem, 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.)

- O 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. Verificar no módulo 2 estas informações.
- 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 de resultados de bactérias resistentes,
 - exames relacionados com diagnóstico de infecção hospitalar
 - exames de urgência: LCR, hemocultura, etc.
 - 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.

3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O microbiologista na sua rotina diária para decidir a importância das bactérias ou fungos isolados deve considerar:

- 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.

3.1. 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:

No caso de dúvida:

- 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 cocobacilos não fermentadores), ou a 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:

Tabela 1 – Relatório quantitativo de exame microscópico pela coloração de Gram

Descritivo	Classificação numérica	Nº Médio de bactérias, células epiteliais, leveduras, neutrófilos /campo 1.000x
Ausente	0	0
Raros	+	1-5
Frequentes	++	6-15
Numerosos	+++	16-30
Incontáveis	++++	>30

- Relatório qualitativo de bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram, descrevendo e quantificando a presença de:
 - Principais 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.
- Presença de bactérias intracelulares (neutrófilos ou fagócitos)
- Presença de 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 e ignorar, são muito relativos, não havendo unanimidade para padrões definitivos de relatórios.

Nota:

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

Como fazer microbiologia é somar evidências (microbiológicas, clínicas, epidemiológicas...), torna-se impossível esgotar todas as possibilidades. O que pode e dever 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 cientificamente embasado.

4. SUGESTÕES DE RELATÓRIOS MICROBIOLÓGICOS POR MATERIAL

4.1. TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

a) 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
- Quando presente relatar associação fuso-espirilar

Patógenos a serem relatados em isolados de cultura:

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

- *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.”

b) 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).

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

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

d) Seios da face - Culturas de aspirados intra-operatórios ou obtidos por punção devem ser relatados:

- 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).

Obs: rino-sinusite infecciosa aguda e não complicada na maioria das vezes é de etiologia viral. Ressaltando-se as 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.

e) 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.

4.2. ESCARRO

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

Quando a bacterioscopia revelar >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 < 10 células epiteliais, predomínio de leucócitos e quando houver predomínio de um tipo morfológico de bactéria. Este critério mais rigoroso, pois o anterior era >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*.

4.3. SECREÇÃO ENDOTRAQUEAL/LAVADO TRAQUEAL/LAVADO BRÔNQUICO:

Rotina para lavado brônquico, escarro e secreção traqueal

1. Homogeneizar muito bem a amostra, por pelo menos 1 minuto.
2. Fluidificar com 1,0ml de solução salina estéril ou com N-acetil-cisteína as secreções traqueais muito espessas.
3. Pode-se também utilizar pérolas de vidro estéreis na homogeneização do material.
4. Confeccionar lâmina para coloração de Gram.
5. Centrifugar 7 ml e corar o sedimento, quando processar lavado brônquico.
6. Corar o material direto, sem centrifugar, quando processar escarro e secreção traqueal.
7. Fixar cuidadosamente o esfregaço seco sobre a chama.
8. Observar ao Gram (imersão) a presença de bactérias intracelulares que devem ser reportadas caso ultrapassem 7%.
9. 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, reportar **como Material Inadequado**.
10. Confeccionar também lâminas para coloração de BAAR e pesquisa de fungos, quando necessário.
11. Plaquear volume de 1 μ l (alça calibrada) em meios de MC, MN, AS e AC (atmosfera CO_2).
12. Incubar todas as placas por 24 horas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ e realizar a primeira leitura quantitativa.
13. Reincubar por mais 24 horas nos casos de difícil diferenciação macroscópica entre colônias.
14. Multiplicar o número de cada tipo de colônia identificada pelo fator 10^3 .
15. Interpretar como significativo as contagens $\geq 10^5$ UFC do lavado brônquico, escarro ou secreção traqueal.
16. Realizar antibiograma somente para as colônias com contagens significativas.
17. Liberar apenas a identificação, sem TSA, para microrganismos em contagens inferiores a 10^5 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.

4.4. 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

1. Passar assepticamente a escova para um tubo contendo 1,0ml de solução salina estéril.
2. Homogeneizar muito bem em vórtex por pelo menos 1 minuto.
3. Confeccionar lâmina para Gram com pipetor de 10 µl ou alça calibrada de mesmo volume.
4. Deixar que a lâmina seque por 30 minutos dentro da estufa.
5. Completar a fixação do esfregaço cuidadosamente sobre a chama.
6. Confeccionar também lâminas para coloração de BAAR e pesquisa de fungos, quando necessário.
7. Plaquear 10 µl (alça calibrada ou pipetor) em MC, MN, AS e AC (CO₂).
8. Plaquear 1 µl (alça calibrada) em MC, MN, AS, AC (CO₂)
9. Incubar todas as placas por 24 horas a 35 ± 1° C e realizar a primeira leitura quantitativa.

10. Reincubar por mais 24 horas nos casos de difícil diferenciação macroscópica entre colônias.
11. Multiplicar a contagem dos tipos de colônias identificadas pelo fator, de acordo com o volume plaqueado.
12. Multiplicar pelo fator 10^2 quando o volume plaqueado foi 10 μL .
13. Multiplicar pelo fator 10^3 quando o volume plaqueado foi 1 μL .
14. Quando for conhecido o valor de solução fisiológica utilizado na técnica do BAL, deve-se considera-lo como mais um fator de correção. Por exemplo: se forem utilizados 10, 20 ou 100 mL; multiplicar por 10, 20 ou 100, respectivamente.
15. Interpretar como significativo para o diagnóstico de pneumonia contagens:
 - a) $\geq 10^3$ ufc para Escovado Brônquico Protegido;
 - b) $\geq 10^4$ ufc para BAL
16. Realizar antibiograma somente para as colônias com contagens significativas.
17. 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 μL e 8 com a alça de 1 μL , além de 5 colônias de *Streptococcus viridans* apenas na semeadura com 10 μL .

Cálculo:

Pseudomonas aeruginosa –

- 10 (sol. Fisiológica) x 80 (nº de colônias) x 100 (alça de 10 μL) = 80.000 (ou $8 \cdot 10^4$ ufc/mL)
- 10 (sol. Fisiológica) x 8 (nº de col.) x 1000 (alça de 1 μL) = 80.000 (ou $8 \cdot 10^4$ ufc/mL)

Streptococcus viridans –

- 10 (sol. Fisiológica) x 5 (nº de col.) x 100 (alça de 10 μL) = 5.000 (ou $5 \cdot 10^3$ ufc/mL)

Relatar:

- *Pseudomonas aeruginosa* - 8.10^4 ufc/mL
 - com antibiograma
- *Streptococcus viridans* – 5.10^3 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, 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) isolados
 - 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.

Tabela 2 - 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:

Pneumonia causada por *Candida spp* é considerado 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, cara e com efeitos colaterais e seletora 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.

4.5. 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 contactar o clínico e solicitar nova coleta com anti-sepsia rigorosa.

4.6. 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 cultura revelar bactérias potenciais contaminantes de pele. Outras causas de abscesso devem ser consideradas (neoplasia, infarto, etc.).

4.7. 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: podem ser atribuídas à *N. gonorrhoeae* em recém-nascidos. A presença de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* configura são outras possibilidades etiológicas.

O 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.

4.8. 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: *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.

4.9. FEZES

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

No caso de realizar cultura para *Campylobacter* de rotina, incluí-lo no relatório. Lembrar que diarreia/enterocolite em pacientes com >3dias de hospitalização e fazendo uso de antimicrobianos pode ser *Clostridium difficile* pesquisando a toxina com kits específicos.

Diarreia com mais de 7dias de duração em imunocomprometidos pode ser por parasitas (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora belli* e em paciente com HIV, complexo do *Mycobacterium avium*).

4.10. PELE, ABSCESSOS e FERIDAS - Considerações

- Abscesso tecido subcutâneo
- Abscesso cerebral
- Abscesso intra-abdominal

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 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 raro as enterobactérias.
- 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 podem ser isoladas como possíveis contaminantes de pele ou mucosas, 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 anaeróbios estritos. 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.

a) 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

Dão respaldo a possibilidade de isolamento de agente patogênico quando são atendidos os seguintes requisitos: **a)** Coleta bem feita. **b)** Bacterioscopia concordante com a cultura e **c)** Ocorrem muitas colônias de uma mesma bactéria, isoladas em cultura pura ou em nítido predomínio.

b) 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 à CCIH.

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

c) Dreno/Fístula - São materiais que não deveriam 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.

d) 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. Utiliza-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 $>10^4$ UFC/g tecido

Para os demais casos:

- Bacterioscopia negativa ou discordante
- Culturas polimicrobianas
- Isolamento de bactérias da flora cutâneo-mucosa (*Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, corineformes, *Neisseria spp*, etc)
- Baixas contagens $<10^4$ UFC/g de tecido - Relatar o(s) agente(s) isolados sua contagem sem antibiograma e guardar a(s) bactéria(s) por sete dias.

e) Gânglio - O gânglio quando infectado pode revelar agentes importantes de doenças localizadas ou sistêmicas, de origem:

- bacteriana (incluindo os fastidiosos), raramente anaeróbios,
- 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 realizados os exames microscópicos (Gram, direto com KOH 10%, Giemsa) e culturas para bactérias em meios ricos, fungos e micobactérias e 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.

4.11. GENITAL

a) Uretral - os principais agentes etiológicos das uretrites estão bem estabelecidos: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma spp* e *Herpes simplex* vírus. Raramente *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus spp* e outros.

Colher sempre lâmina para bacterioscopia:

- Para *Trichomonas* pode-se colher urina e centrifugar para fazer pesquisa no sedimento imediatamente após a coleta.
- Para *Chlamydia* o diagnóstico melhor é imunológico (Imunofluorescência)
- Para *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 e concluir: sugerindo, 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: "Bacteria raramente isolada como agente de uretrite; sugerimos investigar outras causas como *Chlamydia*, *Micoplasmas*, *Trichomonas* etc."

b) 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).
- 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, mas caro é o E-test®)
- 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 raras 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: p. ex. *E. coli*, *Enterococcus spp*, *S. aureus*, etc.”

c) 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.

d) Esperma e/ou Flúido 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 uL e fazer contagem de colônias

Relatar os achados de bacterioscopia, contagem de leucócitos e bactéria isolada em contagens $\geq 10^3$ Ufc/mL. No caso de enterobactérias, enterococos e *Pseudomonas* fazer antibiograma.

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

4.12. URINA - Interpretação de Uroculturas

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

- Paciente com sintomas de infecção urinaria? Leucocitúria?
- Idade/sexo
- Gestante
- Tipo de coleta: jato médio, coletor, punção de sonda vesical em sistema fechado, punção supra-púbica, etc.
- Uso prévio de antibióticos à coleta da presente amostra, etc.

4.12.1 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: difteroides, *Streptococcus viridans*, Lactobacilos, e estafilococos coagulase negativa outros que não sejam classificados como *Staphylococcus saprophyticus*.

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

- Um provável patógeno $\geq 10^5$ UFC/ml
 - Definitivamente identificar a nível de espécie.
 - Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
 - No caso de paciente assintomático solicitar nova amostra, trata-se de provável bacteriúria assintomática.

- No caso da presença de outras espécies em contagens $<10^4$ UFC/ml, relatar número de microrganismo(s) presentes em $<10^4$ UFC/ml.
- Um provável contaminante em $\geq 10^5$ UFC/ml (difteróides, *Streptococcus viridans*, lactobacilos, e estafilococos coagulase negativa outros que não sejam *Staphylococcus saprophyticus*.)
 - Realizar uma identificação limitada: exemplo distinguir *entre S. saprophyticus* de outros estafilococos coagulase negativa, ou *Streptococcus agalactiae* (grupo B) de *Streptococcus viridans*. Não fazer antibiograma e sugerir nova coleta.
 - É raro, mas não impossível, ocorrer infecção urinária por bactérias da microbiota da uretra ou vagina. Para caracterizar ITU há necessidade de confirmar o achado com nova urocultura, e que esteja associada a sintomas. Sintomas e leucocitúria tornar muito provável o diagnóstico. Sem sintomas pode ser bacteriúria assintomática ou falha grosseira na coleta.
 - Enumerar outras espécies eventualmente presentes $<10^4$ UFC/ml
- Dois prováveis patógenos em $\geq 10^5$ UFC/ml, com um diagnóstico infecção do trato urinário crônica ou recorrente.
 - Definitivamente identificar a nível de espécie.
 - Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
- Dois prováveis patógenos em $\geq 10^5$ UFC/ml com sintomas de ITU
 - Identificar a nível de espécie.
 - Realizar o teste de sensibilidade (antibiograma).
 - Solicitar nova amostra para confirmação
- Mais que dois microrganismos em $>10^5$ UFC/ml.
 - Reportar: “Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura.”

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

- Um provável patógeno $\leq 10^5$ UFC/ml
 - Para pacientes sob antibioticoterapia, grávidas, recém-nascidos, infecção urinária de repetição, realizar identificação e teste de sensibilidade.

- Um potencial patógeno presente em $>10^2$ UFC/ml em mulheres sintomáticas – Fazer identificação e antibiograma.
- Um potencial patógeno presente em $>10^3$ UFC/ml em homens sintomáticos – Fazer identificação e antibiograma.
- Sem informação clínica.
 - 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.
- Um provável contaminante $\leq 10^5$ UFC/ml.
 - Leucócitos normais: descritivamente identifique o isolado
 - Leucócitos aumentados: solicite nova amostra
- Dois ou mais microrganismos presentes em $<10^4$ UFC/ml.
 - Relatar:
 - “Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura.”

4.12.2. Urinas Coletadas por Cateterização

a) Contagem de colônias $>10^4$ UFC/ml:

- Dois ou mais prováveis patógenos presentes em $>10^4$ UFC/ml.
 - 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 em $>10^4$ UFC/ml.
 - Reportar o(s) microrganismo(s) presente(s) com descrição do tipo(s) morfológico(s), exemplo, difteróides, *Streptococcus* do grupo viridans.
 - Reportar:
 - “Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura.”
- Um provável patógeno e um provável contaminante.
 - Identificar o provável patógeno e fazer antibiograma
 - Fornecer o tipo morfológico do provável contaminante.
- Três ou mais microrganismos
 - Fornecer uma descrição dos tipos morfológicos

- Reportar:

“Múltiplos microrganismos presentes; provável contaminação, repetir a cultura.”

b) Contagem de colônias $<10^4$ UFC/ml:

- Para pacientes sob antibioticoterapia, mulheres sintomáticas, homens sintomáticos, realize 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.

4.12.3. Urinas Coletadas por Punção Suprapúbica

a) Um ou dois microrganismos presentes

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

b) Três ou mais microrganismos presentes

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

c) Sem crescimento

- Examine em até 48 horas de incubação
- Reporte “Sem crescimento, teste com sensibilidade de $>10^2$ UFC/ml “em 48 h (para semeadura de $10\mu\text{l}$).

4.12.3. OBSERVAÇÕES

a) Não realizar cultura de ponta de sonda vesical

b) O 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.

- c) Realize pesquisa para anaeróbios somente em punções supra-púbicas, quando solicitado.
- d) 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 número de diferentes microrganismos encontrados e sua contagem e solicite nova amostra.

4.13. 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 e se paciente tiver cateter mais uma amostra obtida do catéter.

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 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 paciente com cateter, possível colonização.”

Outras bactérias que, isoladas em uma única amostra, são sugestivos de contaminação: *Micrococcus spp*, corineformes, *Propionibacterium spp*, *Bacillus spp*.

Hemoculturas positivas e repetidas para bactérias potencialmente contaminantes podem ser considerados patogênicos 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.

Tabela 3 - relação entre idade e volume ideal de sangue a ser coletado

Idade	volume
< 1 mes	1-2 mL
1m a 2a	2-3 mL
>2 a a 10 a	3-5mL
Adolescente	10-20mL
Adulto	40mL

4.14. Ponta de Cateter

Cultura qualitativa não se justifica fazer 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 24h.

Considerando que a colonização de cateter é muito comum, identificar bactérias do cateter e fazer antibiograma não se justificam, se não houver bacteremia, 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.

5. REFERÊNCIAS:

1. BARENFANGER, J. Improving the clinical utility of microbiology data: an update. Clinical Microbiology Newsletter, **25(1)**:1-8, 2003.

2. ISENBERG H.D. **Essential Procedures for Clinical Microbiology**, p. 95-101, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998.
3. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN Jr, W.C. Staphylococci and related organisms in: **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5th ed., Lippincot, 1997. 121-170.
4. SCHRECKENBERGER, P. Questioning dogmas: proposed new rules and guidelines for the clinical microbiology laboratory. *ASM News*, **67**: 388-89, 2001.