

**U. PORTO**



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado em Análises Clínicas

---



**Relatório de estágio**  
**Microbiologia – Química Clínica**

---

Sara Isabel Mendes Moreira

Setembro de 2012



## 1. Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Índice.....  | ii |
| 2. Índice de ilustrações .....                                    | v  |
| 3. Introdução .....   | 7  |
| 4. Descrição do local de estágio .....                            | 8  |
| 5. Fase Pré-analítica .....                                       | 12 |
| 6. Instruções de Colheita .....                                   | 13 |
| 6.1. Urinas .....   | 13 |
| 6.2. Fezes.....   | 15 |
| 6.3. Expetoração .....  | 17 |
| 6.4. Exsudado faríngeo (ou orofaríngeo).....                      | 18 |
| 6.5. Exsudado nasal .....   | 18 |
| 6.6. Exsudado nasofaríngeo.....                                   | 18 |
| 6.7. Sémen.....   | 19 |
| 6.8. Exsudado purulento.....                                      | 20 |
| 6.9. Raspados de pele e anexos cutâneos (unha, pelo/cabelo) ..... | 20 |
| 6.10. Exsudado vaginal .....                                      | 21 |
| 6.11. Exsudado uretral.....                                       | 21 |
| 6.12. Hemoculturas .....  | 22 |
| 7. Análises realizadas.....                                       | 23 |
| 7.1. Urinas .....   | 23 |
| 7.1.1. Exame sumário da urina .....                               | 24 |
| 7.1.2. Observação microscópica do sedimento urinário.....         | 29 |
| 7.1.3. Teste de gravidez.....                                     | 31 |
| 7.1.4. Contagem de Addis .....                                    | 32 |

---

|   |    |
|---|----|
| 7.1.5. Contagem minutada.....   | 33 |
| 7.1.6. Urina 24 horas .....   | 33 |
| 7.1.7. Exame Bacteriológico.....                                      | 34 |
| 7.2. Fezes.....   | 48 |
| 7.2.1. Exame Parasitológico.....                                      | 48 |
| 7.2.2. Exame Bacteriológico .....                                     | 49 |
| 7.2.3. Pesquisa de sangue oculto .....                                | 57 |
| 7.2.4. Grau de digestão das fezes .....                               | 57 |
| 7.3. Expetoração.....   | 58 |
| 7.3.1. Pesquisa de BAAR.....  | 58 |
| 7.3.2. Exame Bacteriológico + Exame Micológico .....                  | 59 |
| 7.3.3. Exame Cultural em Lowenstein .....                             | 60 |
| 7.4. Exsudado faríngeo .....  | 61 |
| 7.5. Exsudado nasal.....  | 62 |
| 7.5.1. Pesquisa de Eosinófilos.....                                   | 62 |
| 7.5.2. Exame Bacteriológico .....                                     | 62 |
| 7.6. Exsudado nasofaríngeo .....                                      | 62 |
| 7.7. Sêmen.....   | 63 |
| 7.7.1. Espermograma.....  | 63 |
| 7.7.2. Espermocultura - Exame Bacteriológico + Exame Micológico ..... | 63 |
| 7.8. Exsudado purulento.....  | 64 |
| 7.8.1. Exame Bacteriológico + Exame Micológico.....                   | 64 |
| 7.9. Raspados de pele e anexos cutâneos (unha, pelo/cabelo) .....     | 65 |
| 7.9.1. Exame Micológico.....  | 65 |
| 7.10. Exsudado vaginal .....  | 65 |
| 7.10.1. Exame Parasitológico.....                                     | 66 |
| 7.10.2. Exame Bacteriológico + Exame micológico.....                  | 66 |

|   |    |
|---|----|
| 7.10.3. Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo B.....        | 67 |
| 7.11. Exsudado uretral.....                                     | 68 |
| 7.11.1. Exame parasitológico.....                               | 68 |
| 7.11.2. Exame Bacteriológico + Exame Micológico .....           | 68 |
| 7.11.3. Pesquisa de <i>Mycoplasma</i> e <i>Ureaplasma</i> ..... | 68 |
| 7.12. Hemoculturas .....  | 69 |
| 7.12.1. Exame Bacteriológico + Exame Micológico .....           | 69 |
| 8. Conclusão .....  | 70 |
| 9. Bibliografia .....   | 71 |

## 2. Índice de ilustrações

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Fachada do LabMED.....   | 7  |
| Figura 2 – Bancada principal do setor. ....   | 8  |
| Figura 3 – Bancada para o processamento das fezes. ....   | 8  |
| Figura 4 – Zona com as estufas. ....  | 9  |
| Figura 5 – Auto-analisadores Clinitek Atlas. ....   | 10 |
| Figura 6 – Centrífugas.....   | 10 |
| Figura 7 – Bancada com microscópios.....  | 11 |
| Figura 8, 9 e 10 – Diversas amostras identificadas com código de barras. ....   | 12 |
| Figura 11 – Tabuleiro com amostras de urina marcadas apenas com código de barras.   | 23 |
| Figura 12 - Tabuleiro com amostras de urina numeradas sequencialmente a azul e a verde. ....                                    | 23 |
| Figura 13 – Lâmina “Precision cell” utilizada para observação do sedimento urinário.  | 29 |
| Figura 14 – Após agitar o frasco de urina, remove-se a tampa. ....  | 34 |
| Figura 15 – Inserimos a ansa descartável na urina. ....   | 34 |
| Figura 16 – Semeamos a urina num quadrante do meio CPS.....   | 35 |
| Figura 17 – Os meios de cultura são colocados na estufa.....  | 35 |
| Figura 18 – Gelose CPS3 com crescimento de diferentes microrganismos, em que é evidente o fato de ser um meio cromogénico. .... | 36 |
| Figura 19 – Meio de cultura CPS3, com diferentes microrganismos isolados.....   | 37 |
| Figura 20 – Crescimento em placa inferior a $10^3$ UFC/mL. ....   | 38 |
| Figura 21 e 22- Meio de cultura com flora contaminante e crescimento inferior a $10^4$ UFC/mL.....                              | 38 |
| Figura 23 – Crescimento em placa igual ou superior a $10^5$ UFC/mL.....   | 39 |
| Figura 24- Isolamento de <i>Escherichia coli</i> em CPS3. ....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 25 – Isolamento de <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus</i> indologénico, <i>Providencia</i> ou <i>Morganella</i> em CPS3. ....   | 40 |
| Figura 26 – Isolamento de <i>Enterococcus spp.</i> em CPS3. ....  | 41 |
| Figura 27 e 28 – Isolamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em CPS3.....  | 41 |
| Figura 29 – Isolamento de <i>Streptococcus agalactiae</i> em CPS3. ....   | 42 |
| Figura 30 – Isolamento de <i>Candida albicans</i> em CPS3. ....   | 42 |
| Figura 31 – Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em CPS3. ....  | 42 |
| Figura 32 – Bacilos Gram negativo observados ao microscópio ótico.....  | 43 |
| Figura 33- Cocos Gram positivo observados ao microscópio ótico.....   | 44 |
| Figura 34 – Aparelho da Siemens MicroScan WalkAway 96.....  | 45 |
| Figura 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 – Preparação do inóculo e do painel.....   | 47 |
| Figura 43 – Colónias de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (apontadas) não fermentam o sorbitol, surgindo como colónias incolores no meio de sorbitol MacConkey.....                   | 51 |
| Figura 44, 45 e 46 – Isolamento de <i>Shigella</i> nos diferentes meios de cultura usados. .  | 53 |
| Figura 47, 48 e 49 - Isolamento de <i>Salmonella</i> nos diferentes meios de cultura usados. ....   | 54 |
| Figura 50 – Isolamento de <i>Yersinia spp.</i> que fermenta o manitol presente no meio, e as colónias adquirem uma aparência de olho de boi (parte central da colónia vermelha). 55 |    |
| Figura 51 – Colónias de <i>Campylobacter jejuni</i> no meio seletivo <i>Campylobacter</i> .....   | 56 |
| Figura 52 – Isolamento de <i>Streptococcus agalactiae</i> na gelose chromID™ Strepto B..67  |    |





### 3. Introdução

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no departamento de Microbiologia do LabMED durante o período compreendido entre Setembro de 2009 e Abril de 2011, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, frequentado na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

O Grupo LabMED é fruto de uma elevada experiência e tradição nas diversas áreas de diagnóstico e teve a sua génese na Clínica Laboratorial Mário Moreira, fundada em 1959.



**Figura 1 – Fachada do LabMED.**

Hoje é um dos maiores grupos portugueses, e tem um compromisso com a evolução tecnológica de forma a garantir e exceder a satisfação das necessidades dos clientes, e também aumentar a motivação e grau de satisfação dos colaboradores.

## 4. Descrição do local de estágio

Os recursos humanos do departamento de microbiologia são constituídos por uma farmacêutica especialista em análises clínicas, 3 técnicas superiores e 2 auxiliares de laboratório.

A área de trabalho é ampla e bem iluminada sendo constituída por diversas zonas:

Zona 1 - área grande onde se encontram a maioria dos equipamentos e bancadas.



**Figura 2 – Bancada principal do setor.**

Zona 2 - área onde se realiza o processamento das fezes.



**Figura 3 – Bancada para o processamento das fezes.**

Nesta área também se encontram as estufas:

Estufa 1 – usada para incubação de geloses de sangue e chocolate, a 35°C com 5% CO<sub>2</sub>;

Estufa 2 – usada para incubação das pesquisas de *Campylobacter*, a 42°C em atmosfera de microaerofilia;

Estufa 3 – usada para incubação do meio de Lowenstein-Jensen a 37°C;

Estufa 4- usada para avaliar o crescimento dos fungos a 30°C;

Estufa 5 – usada para incubação de diversos meios (CPS, Sabouraud), das diferentes amostras) a 35°C ± 2°C.



**Figura 4 – Zona com as estufas.**

Zona 3 – área menor de armazenagem (é usada para guardar os produtos requisitados ao armazém, e contém um frigorífico para meios de cultura e reagentes utilizados).

Zona 4 – vestiário.

Zona 5 – gabinete (usado para a inserção de resultados e validação de boletins).

Zona 6 - área dedicada à Química Clínica de urinas, onde se encontram os auto-analisadores e as centrífugas.



**Figura 5 – Auto-analisadores Clinitek Atlas.**



**Figura 6 – Centrífugas.**

Neste sector além da valência de Microbiologia (visando a Bacteriologia, Micologia, Parasitologia e certas análises de Virologia) são levadas a cabo análises da valência de Química Clínica (nomeadamente o exame sumário de urina e a observação microscópica do sedimento urinário).



**Figura 7 – Bancada com microscópios.**





## 5. Fase Pré-analítica

Devido ao elevado número não só de amostras mas também de análises no laboratório em causa e no departamento de Microbiologia em particular, a fase pré-analítica reveste-se de redobrada importância, uma vez que é fundamental a correta identificação das amostras e dos pedidos analíticos respetivos.

É ainda importante assegurar um correto processamento das amostras, particularmente quando são provenientes de postos de colheita.

A cada paciente é atribuído um código de barras e todas as suas amostras são identificadas com o mesmo.



Figura 8, 9 e 10 – Diversas amostras identificadas com código de barras.





## 6. Instruções de Colheita

É necessário assegurar que a colheita se processa de modo a conseguir a melhor amostra possível, isto é, a mais adequada para as análises a que se destina, independentemente da colheita ser da responsabilidade do técnico ou do próprio utente de acordo com as instruções do laboratório.

### 6.1. Urinas

Caso se destinem apenas a exame sumário idealmente seriam recolhidas no laboratório, 1 a 2 horas após a 1ª emissão da manhã. Para maior conforto dos utentes também é permitida a recolha do 1º jacto da 1ª urina da manhã, desde que esta seja guardada no frigorífico e entregue no laboratório, no máximo 2 horas após a recolha.

O recipiente deve ser um frasco plástico, de boca larga, sem conservantes, de capacidade não inferior a 50mL, não esterilizado mas quimicamente limpo, e com tampa bem adaptada, de modo a que o seu conteúdo não verta <sup>(1)</sup>.

Caso se destinem a exame bacteriológico, recomenda-se a recolha do 2º jacto da 1ª urina da manhã (colheita do jacto médio), após lavagem cuidadosa da região urogenital e área circundante (com água e sabão; não devem ser usados toalhetes ou soluções antissépticas). Se a urina não for enviada dentro da 1ª hora ao laboratório, deve ser refrigerada a 4°C para se evitarem alterações na morfologia celular e alterações bioquímicas devidas à multiplicação bacteriana.

O recipiente de colheita deverá ser de plástico, sem conservantes, de capacidade não inferior a 50mL, esterilizado, e com tampa bem adaptada, de modo a que o seu conteúdo não verta <sup>(1)</sup>.

Nos bebés (sem controlo dos esfíncteres) a recolha deve ser feita no laboratório e deve ser executada uma lavagem antes da colocação do saco coletor; no entanto se o bebé não urinar ao final de 30 minutos o saco deve ser substituído, e todo o procedimento de lavagem repetido <sup>(1)</sup>.

A prescrição e a toma de antimicrobianos devem ser sempre comunicadas ao laboratório e registadas, assim como a técnica de colheita (por exemplo se a urina foi colhida por punção suprapúbica, é necessário valorizar qualquer crescimento).

É necessário ter sempre presente informação relativa ao sexo e idade do doente, bem como outras condições (por exemplo gravidez) para a avaliação de resultados e do respetivo antibiograma.

Para a recolha das urinas de 24 horas deve ser rejeitada toda a 1ª urina da manhã, e anotar a hora desta micção. Toda a urina das 24 horas seguintes deve ser recolhida para frasco apropriado fornecido pelo laboratório (este frasco pode conter conservantes, ácidos ou bases, pelo que deve ser manuseado com cuidado). A recolha termina à mesma hora do dia seguinte, altura em que o utente deverá urinar, para recolher toda a urina que estiver na bexiga. Durante a recolha e até ser transportado até ao laboratório, o frasco deve ser mantido no frigorífico <sup>(1)</sup>.

Para a contagem de Addis é solicitada como amostra a urina de 12 horas, ou seja, o utente deve rejeitar toda a 1ª urina da manhã, e anotar a hora desta micção. Toda a urina das 12 horas seguintes deve ser recolhida para frasco apropriado fornecido pelo laboratório. A recolha termina no final das 12 horas, altura em que deverá urinar para recolher toda a urina que esteja na bexiga. Durante a recolha e até ser transportado ao laboratório, o frasco deve ser mantido no frigorífico <sup>(1)</sup>.

Para a contagem minutada é solicitada como amostra a urina de 3 horas, ou seja, o utente deve rejeitar toda a 1ª urina da manhã, e anotar a hora desta micção. Toda a urina das 3 horas seguintes deve ser recolhida para frasco apropriado fornecido pelo laboratório. A recolha termina no final das 3 horas, altura em que deverá urinar para recolher toda a urina que esteja na bexiga. Durante a recolha e até ser transportado ao laboratório, o frasco deve ser mantido no frigorífico <sup>(1)</sup>.

## 6.2. Fezes

Solicita-se que as colheitas sequenciais destinadas a exame parasitológico sejam recolhidas para recipientes estéreis, em dias não consecutivos <sup>(2)</sup>.

Deve ser recolhida uma pequena porção de fezes (tamanho de meia noz) pra um recipiente fornecido pelo laboratório. Os frascos devem ser guardados na porta do frigorífico até serem entregues <sup>(2)</sup>.

No caso de haver expulsão de vermes visíveis à vista desarmada, estes devem ser enviados ao laboratório na sua totalidade para poderem ser identificados <sup>(2)</sup>.

Para exame bacteriológico (coprocultura) não é necessária qualquer dieta e o doente deve defecar diretamente para o recipiente fornecido pelo laboratório (frasco esterilizado e de boca larga; este não deve ficar demasiado cheio) <sup>(2)</sup>.

A entrega no laboratório deve ser feita no dia da colheita.

Amostra aceitável:

- É a amostra fecal não contaminada com urina, que é transportada ao laboratório até 2h após a colheita e conservada em local fresco. Deve ser colhida diretamente para o frasco;
- Se se tratar de uma zaragatoa ou de uma biópsia estas devem ser humedecidas com água destilada estéril, para evitar a dessecação;
- Para o estudo de *Clostridium difficile* e vírus se não se puder processar logo a amostra, esta deve ser congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  <sup>(2)</sup>.

Amostra inaceitável:

- Amostra com mais de duas horas;
- Zaragatoas e biópsias secas;
- Frascos demasiado cheios com risco de rebentarem (risco de contaminarem o meio ambiental ou quem com eles trabalha) <sup>(2)</sup>.

Para a pesquisa de sangue oculto não é necessário que o utente faça qualquer dieta. O utente deve recolher uma pequena porção de fezes (tamanho de meia noz) para um recipiente fornecido pelo laboratório ou adquirido na farmácia <sup>(2)</sup>.

Pedido médico de 3 amostras: fazer a colheita em três dias consecutivos.

Pedido médico de 6 amostras: fazer a colheita em três dias consecutivos, tirando duas amostras por dia, em defecações diferentes.

Guardar na porta do frigorífico até à entrega no laboratório.

Recomendações:

- Não iniciar a recolha da amostra em caso de hemorróidas a sangrar ou durante o período menstrual;
- As fezes devem ser frescas e não devem estar contaminadas por urina;
- Os frascos não devem ser demasiados cheios para não rebentarem <sup>(2)</sup>.

Para analisar o grau de digestão das fezes, nos 3 dias que antecedem a colheita o doente deve fazer uma alimentação variada: proteínas, hidratos de carbono, lípidos (carne, leite, batata, feijão, manteiga).

Não deve usar laxantes (alteram por completo a interpretação do exame).

Deve recolher a parte média da dejeção, em geral mais uniforme, evitando a contaminação com urina, água ou outro elemento.

Manter as fezes refrigeradas caso não sejam imediatamente entregues no laboratório <sup>(2)</sup>.

### 6.3. Expetoração

Para o exame bacteriológico é suficiente 1 única amostra de boa qualidade, apenas para a pesquisa de micobactérias são necessárias 3 amostras em dias consecutivos <sup>(3)</sup>.

Para o exame bacteriológico as amostras devem ser transportadas o mais rapidamente possível ao laboratório, à temperatura ambiente <sup>(3)</sup>.

Para pesquisa de micobactérias, enquanto aguardam transporte, as amostras devem ser refrigeradas a 4°C <sup>(3)</sup>.

É preferível a 1ª amostra da manhã em jejum; basta lavar a boca e gargarejar só com água antes de iniciar a colheita <sup>(3)</sup>.

A colheita deve ser feita para um recipiente estéril (de boca larga e de encerramento hermético), depois de provocada uma “tosse profunda” <sup>(3)</sup>.

Não devem ser aceites amostras com predomínio de saliva <sup>(3)</sup>.

Se o doente não conseguir expetorar, a expetoração pode ser induzida por:

- Nebulização efetuada apenas com NaCl 0,85% (inalar 20 a 30 ml de uma solução de 3 a 10% de NaCl 0,85% em H<sub>2</sub>O).

Este procedimento não é recomendado em caso de suspeita de tuberculose <sup>(3)</sup>.

Também existem métodos de colheita invasivos para recolha de amostras das vias respiratórias inferiores:

- Aspiração endotraqueal - aspirar as secreções brônquicas e colocar em recipiente esterilizado com tampa de rosca;
- Broncoscopia – permite colher lavado brônquico ou broncoalveolar (enviar as amostras em recipiente esterilizado com tampa de rosca e hermético, marcando a ordem da colheita) e escovado com catéter duplamente protegido (depois de retirar o catéter exteriorizar a escova da colheita e cortar assepticamente a escova para dentro do recipiente esterilizado com 1 ml de lactato de Ringer);
- Biópsia brônquica (colocar em recipiente esterilizado com uma pequena quantidade de água destilada esterilizada para evitar a secagem) <sup>(3)</sup>.

#### **6.4. Exsudado faríngeo (ou orofaríngeo)**

Orientar a iluminação no sentido de ter uma boa visualização do local da colheita e baixar a língua com espátula.

Colher com zaragatoa entre os pilares e por detrás da úvula – faringe posterior, amígdalas e qualquer área inflamada ou ulcerada, evitando tocar na mucosa bucal e língua <sup>(4)</sup>.

Enviar o mais rapidamente, no meio de transporte apropriado ao microrganismo a pesquisar.

Não se deve proceder à colheita se existir inflamação da epiglote, pois pode causar espasmos com consequente obstrução respiratória <sup>(4)</sup>.

#### **6.5. Exsudado nasal**

A colheita é feita inserindo uma zaragatoa estéril em cada narina até encontrar resistência (mais ou menos a nível dos cornetos) e rodando a zaragatoa contra a mucosa nasal. Colocar, eventualmente em meio de transporte, e enviar rapidamente ao laboratório <sup>(5)</sup>.

#### **6.6. Exsudado nasofaríngeo**

Cuidadosamente introduzir uma zaragatoa flexível de alginato de cálcio através do nariz e colocá-la em recipiente esterilizado com o meio de transporte adequado <sup>(5)</sup>.

### 6.7. Sémen

Para realizar o espermograma solicita-se que a colheita seja efetuada no laboratório por masturbação, após 3 dias sem relações sexuais <sup>(6)</sup>.

O esperma (volume total da ejaculação) deve ser recolhido para um recipiente esterilizado.

É importante que o esperma seja colhido em boas condições de higiene pessoal. Não se devem aplicar cremes e antes da colheita o utente deve tomar duche com água e sabão.

Após a colheita, o esperma deverá ser entregue no laboratório o mais rapidamente possível (até 30 minutos), e mantido aproximadamente a 37°C, pelo que deve ser transportado junto ao corpo <sup>(6)</sup>.

Para realizar a espermocultura a amostra de esperma deve ser recente e colhida em recipiente esterilizado, e a colheita deve ser efetuada após higiene dos órgãos genitais <sup>(6)</sup>.

No caso de amostras para a pesquisa de *Mycoplasma/Ureaplasma* o utente não deve ter feito antibioterapia pelo menos nos 7 dias anteriores à colheita <sup>(6)</sup>.

O sémen deve ser colhido por masturbação, em frasco anatómico ou de boca larga, desde que seja inerte e esterilizado <sup>(6)</sup>.

Se a amostra tiver que ser transportada deve usar-se como meio de transporte o caldo de Ureia/Arginina R1. A este caldo, frasco R1, devem junta-se cerca de 200 ml de uma diluição de 1/10 com soro fisiológico esterilizado <sup>(6)</sup>.

Conservação e transporte até 5 horas a 18-25° C e até 24 horas a 4°C <sup>(6)</sup>.

### **6.8. Exsudado purulento**

Todas as amostras têm de ser identificadas com os dados demográficos do doente, data e hora da colheita, identificação do produto, local anatómico da colheita (quando não seja implícito na denominação do produto biológico) - estes dados condicionam a metodologia laboratorial a utilizar.

Todas as amostras têm de ser colocadas em recipientes esterilizados e o transporte ao laboratório e o respetivo processamento devem ser efetuados o mais rapidamente possível, no máximo até duas horas após a colheita.

As amostras que não são transportadas rapidamente ao laboratório, que estejam contaminadas com flora mista da pele, ou ainda que contenham microrganismos de colonização, conduzem a falsos resultados e conseqüentemente a um diagnóstico clínico e respetiva terapêutica incorretos.

A colheita de exsudados de lesões fechadas deve ser feita por punção e aspiração com agulha e seringa (após desinfeção da pele com mistura antisséptica alcoólica, para evitar contaminação). Neste caso o produto pode ser enviado ao laboratório na própria seringa com que foi colhido (depois de retirar agulha e desde que exista forma de fechar a seringa com tampa estéril não perfurante ou cortante) <sup>(5)</sup>.

A colheita de exsudados de lesões abertas é realizada com zaragatoa, que deve ser colocada em meio de transporte <sup>(5)</sup>.

### **6.9. Raspados de pele e anexos cutâneos (unha, pelo/cabelo)**

Os fragmentos de cabelos e raspados de pele e de unhas devem ser colhidos utilizando material estéril (bisturi e pinça) <sup>(5)</sup>.

As amostras devem ser colhidas, de preferência dos bordos ativos das lesões, uma vez que são os locais onde a probabilidade de se isolar o agente etiológico é maior e devem ser acondicionadas numa caixa de Petri ou lâmina (previamente identificadas), também estéril <sup>(5)</sup>.



### 6.10. Exsudado vaginal

São necessárias algumas condições para se fazer uma boa colheita da amostra:

- Ausência de terapia por antibióticos nos dias que precedem a colheita (15 dias para *Chlamydia trachomatis* e 7 dias para outros microrganismos);
- Evitar o período menstrual se possível;
- Abstinência sexual pelo menos 24h antes da colheita;
- Higiene prévia da zona com água e sabão (apenas externamente e sem utilização de produtos antissépticos) <sup>(7)</sup>.

Para a colheita deve ser introduzido o espéculo sem lubrificante (pode ser humedecido com soro fisiológico estéril) <sup>(7)</sup>.

Introduzir a zaragatoa de alginato de cálcio ou dacron no endocolo (2 a 4cm) e rodar fazendo pressão. Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa e efetuar esfregaço na hora. Para evitar discrepância de resultados as 2 zaragatoas devem ser do mesmo local de colheita <sup>(7)</sup>.

Se as zaragatoas não forem processadas de imediato deve usar-se um meio de transporte de carvão, para a pesquisa de microrganismos <sup>(7)</sup>.

Caso as amostras se destinem à pesquisa de Mycoplasma e Ureaplasma utiliza-se o meio específico de ureia/arginina; parte-se a ponta da zaragatoa impregnada de exsudado, e introduz-se nesse meio de transporte <sup>(7)</sup>.

Para a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* é necessário colher células, portanto deve usar-se uma zaragatoa especial mais dura ou com uma pequena escova <sup>(7)</sup>.

### 6.11. Exsudado uretral

Se for possível a colheita deve ser realizada antes da 1ª micção (quando não é possível, esperar pelo menos duas hora após a última micção) <sup>(8)</sup>.

Limpar cuidadosamente a mucosa circundante com gaze esterilizada e introduzir uma zaragatoa fina e flexível com um movimento de rotação cerca de 2 cm dentro da uretra, para o exame direto. Repetir a operação com uma 2ª zaragatoa, para o exame cultural.

Colocar em meio de transporte com carvão <sup>(8)</sup>.

### 6.12. Hemoculturas

Antes de iniciar a colheita verificar se temos o n.º de frascos necessários e adequados.

O local da colheita só deve ser usado para este fim (não se deve aproveitar a existência de cateteres já colocados no utente) e deve ser selecionada uma veia distinta para cada colheita <sup>(9)</sup>.

Procedimento para a colheita:

- 1) Limpar o local da punção com álcool etílico ou isopropílico a 70%;
- 2) A partir do centro esfregar concentricamente o local de punção escolhido com iodopovidona a 1% durante 1 minuto, e deixar secar;
- 3) Não voltar a tocar no local da punção antes da colheita;
- 4) Desinfetar o frasco da colheita - retirar a proteção da rolha e inutilizá-la; desinfetar a rolha de borracha dos frascos com álcool a 70 % e deixar secar;
- 5) Colheita de Sangue só para frascos de hemoculturas do BACTEC:
  - Bactec Peds Plus, pediátrico: 3 ml de sangue;
  - Bactec Plus Aerobic, adulto: 8 -10ml de sangue;
  - Bactec Plus Anaerobic, anaeróbica: 10ml de sangue;
- 6) Misturar bem por inversão, para evitar a formação de coágulos;
- 7) Após a colheita limpar o local de punção com álcool a 70% <sup>(9)</sup>.

Até à chegada ao laboratório os frascos não devem ser nem refrigerados nem introduzidos na estufa. Devem ser transportados o mais brevemente possível ao laboratório e logo de seguida inseridos no BACTEC <sup>(9)</sup>.

## 7. Análises realizadas

### 7.1. Urinas

Devido ao elevado número de amostras de urina que têm de ser processadas diariamente, estas são divididas em três grupos de acordo com os respetivos pedidos analíticos:

- Só tipo II – caso só se realize o exame sumário com ou sem observação microscópica do sedimento urinário (só marcadas pelo código de barras);
- Só bacteriológico – só se realiza o exame bacteriológico e a observação do sedimento urinário (além da identificação com o código de barras são numeradas sequencialmente na tampa com a cor verde);
- Tipo II + Bacteriológico – é realizado o exame sumário, observação do sedimento urinário e exame bacteriológico (além da identificação com o código de barras são numeradas sequencialmente na tampa com a cor azul) <sup>(10)</sup>.



**Figura 11 – Tabuleiro com amostras de urina marcadas apenas com código de barras.**

**Figura 12 - Tabuleiro com amostras de urina numeradas sequencialmente a azul e a verde.**

Esta divisão permite estabelecer um circuito específico para cada um destes grupos, rentabilizando tempo, recursos humanos e materiais.

Além disso torna mais fácil rastrear uma amostra ou um registo de resultados, sempre que necessário.

### 7.1.1. Exame sumário da urina

O sistema Clinitek Atlas combina os princípios da espectroscopia por reflectância com a utilização de tiras impregnadas de reagentes, para fornecer resultados qualitativos e semi-quantitativos <sup>(11)</sup>.

Cada tira contém 11 zonas reativas independentes, impregnadas de substâncias químicas para a deteção de analitos específicos. Adicionalmente, cada tira tem uma almofada não reativa utilizada para a determinação da cor da amostra <sup>(11)</sup>.

Permite determinar o pH e a cor da urina, e ainda testar a presença de proteínas, creatinina, sangue oculto, leucócitos, nitrito, glicose, corpos cetónicos, bilirrubina e urobilinogénio <sup>(11)</sup>.

#### **Aspetto**

Geralmente a urina normal e recentemente emitida é límpida, no entanto muitas vezes surgem urinas opacas, leitosas, levemente turvas, turvas ou muito turvas <sup>(11)</sup>.

Nas urinas alcalinas é frequente o aparecimento de opacidade por precipitação de fosfatos amorfos (ocasionalmente carbonatos) na forma de névoa branca <sup>(11)</sup>.

A urina ácida normal também pode estar opaca devido à precipitação de uratos amorfos, cristais de oxalato de cálcio ou de ácido úrico. Muitas vezes surge a acumulação de uroeritrina (pigmento rosa que é um componente normal da urina) na superfície dos cristais <sup>(11)</sup>.

A turvação pode ser causada pela presença de:

- Leucócitos (confirmada por sedimentação e observação microscópica);
- Bactérias (produzem opalescência uniforme e geralmente estas urinas apresentam cheiro amoniacal pelo desdobramento da ureia pelas bactérias);
- Hemácias (promovem turvação que é confirmada microscopicamente);
- Células epiteliais;
- Espermatozóides e líquido prostático;
- Leveduras;
- Material fecal;
- Cremes vaginais e antissépticos;
- Entre outros <sup>(11)</sup>.

**Cor**

Normalmente a urina emitida por indivíduos saudáveis é amarela, resultante da excreção de três pigmentos: urocromo (amarelo), uroeritrina (rosa) e urobilina (laranja); sendo que estes pigmentos são originados no metabolismo normal do organismo. A intensidade da cor da urina está relacionada com a concentração da amostra, ou seja, de certa forma indica a concentração urinária e o grau de hidratação da pessoa <sup>(11)</sup>.

Quando em repouso, a urina escurece provavelmente pela oxidação do urobilinogénio.

Existem vários fatores e constituintes que podem alterar a cor da urina, incluindo substâncias ingeridas, atividade física, assim como diversos compostos presentes em situações patológicas <sup>(11)</sup>.

As cores comumente encontradas são:

Amarelo-claro ou incolor - é encontrada em pacientes poliúricos, diabetes *mellitus*, diabetes *insipidus*, insuficiência renal, elevado consumo de líquidos, medicação diurética e ingestão de álcool.

Amarelo-escuro ou castanho - é frequente nos estados oligúricos, anemia perniciosa com deficiência de vitamina B12, estados febris, icterícia (na fase inicial, devido à presença anormal de bilirrubina) e exercício vigoroso.

Alaranjada ou avermelhada - é comum em casos de hematúria, hemoglobinúria, mioglobínúria, icterícia hemolítica, porfirinúria, ingestão de certas substâncias (fenolftaleína, beterraba, vitamina A, nitrofurantoína) e contaminação durante o período menstrual.

Castanha ou enegrecida - surge nos utentes com carcinoma de bexiga, glomerulonefrite aguda, alcaptonúria (causada pela deficiência da enzima oxidase do ácido homogentísico) e meta-hemoglobinúria.

Azulada ou esverdeada – surge em casos de infecção por pseudomonas.

Esbranquiçada ou branca leitosa – surge em situações de quilúria (ruptura dos vasos linfáticos para o sistema excretor urinário, causando a saída de linfa; uma vez que esta é rica em quilomicrons confere um aspeto leitoso à urina), lipidúria, fosfatúria e piúria <sup>(11)</sup>.

**pH**

O pH normal da urina pode variar entre 4,6 e 8,0.

Os reagentes são o vermelho de metilo e o azul de bromotimol.

O crescimento bacteriano de certos microrganismos numa amostra pode provocar um desvio alcalino (devido à conversão da ureia em amónia) <sup>(11)</sup>.

**Glicose**

Pequenas quantidades de glicose (<30 mg/dL) são normalmente excretadas pelo rim.

Os reagentes são a glicose oxidase (que causa a oxidação da glicose presente na urina, levando à formação de ácido glucónico e peróxido de hidrogénio) e a peroxidase (que catalisa a reação formadora de cor, podendo esta variar de laranja a vermelho) <sup>(11)</sup>.

**Corpos cetónicos**

Em situações normais não são detetáveis na urina.

Este teste baseia-se na reação do ácido acetoacético com o nitroprussiato de sódio, que leva ao aparecimento de uma cor castanho-escuro <sup>(11)</sup>.

**Nitritos**

A sua presença depende da conversão dos nitratos da dieta a nitritos por bactérias Gram negativo (logo em situações normais não são detectados na urina), e a concentração durante as infeções aumenta com o tempo de retenção da amostra de urina na bexiga. No entanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de bacteriúria significativa, pois podem ocorrer falsos negativos nos casos de incubação curta da urina na bexiga, na ausência de nitratos na dieta ou na presença de microrganismos não redutores <sup>(11)</sup>.

O reagente é o ácido p-arsanílico que forma um composto diazónico ao reagir com os nitritos; este vai acoplar-se ao 1,2,3,4-tetrahidrobenzo(h)quinolina-3-ol levando ao aparecimento de uma cor rosa <sup>(11)</sup>.

## **Proteínas**

A proteína detetada na urina pode ser resultado de distúrbios urológicos ou nefrológicos <sup>(11)</sup>.

A albumina é considerada um marcador apropriado de danos glomerulares e normalmente está presente em concentrações de 0,5-2mg/dL <sup>(11)</sup>.

Na urina normal o valor de proteína total deve ser <15mg/dL <sup>(11)</sup>.

A excreção de proteínas na urina pode ser temporariamente elevada no caso de exercício físico intenso, proteinúria ortostática, desidratação e infecções do trato urinário <sup>(11)</sup>.

Para a deteção de albumina é utilizado um corante de sulfoneftaleína que leva ao aparecimento de uma cor azul <sup>(11)</sup>.

O reagente para a deteção de proteínas é o azul de tetrabromofenol que leva ao aparecimento de uma cor verde <sup>(11)</sup>.

## **Creatinina**

Este teste baseia-se na atividade tipo peroxidase de um complexo de creatinina de cobre <sup>(11)</sup>.

## **Proporção de proteína por creatinina**

A utilização deste parâmetro pode auxiliar no diagnóstico da função renal, minimizando o impacto das alterações causadas pela proteinúria devida a exercício físico e pela diurese <sup>(11)</sup>.

Albuminúria clínica – proporção albumina/creatinina > 58mg albumina/g creatinina

Proteinúria clínica – proporção 300 mg proteína/g creatinina

## **Densidade**

**Bilirrubina**

A urina normal de um adulto contém cerca de 0,02mg/dL de bilirrubina, o que não é detetável, mesmo pelos métodos mais sensíveis, logo quando detetada é relevante <sup>(11)</sup>.

O reagente é a dicloroanilina diazotada, que em meio ácido se acopla à bilirrubina formando uma coloração castanha-amarelada <sup>(11)</sup>.

**Urobilinogénio**

Os resultados das análises à bilirrubina e ao urobilinogénio ajudam no diagnóstico diferencial da icterícia, bem como de outros distúrbios hepáticos e biliares <sup>(11)</sup>.

A deteção baseia-se na reação de Ehrlich, na qual o p-dietilaminobenzaldeído reage com o urobilinogénio, em meio ácido, produzindo uma cor rosa-avermelhada <sup>(11)</sup>.

**Sangue**

O sangue oculto surge na urina sob a forma de eritrócitos intactos e hemoglobina, em casos de distúrbios urológicos, nefrológicos e hemorrágicos <sup>(11)</sup>.

A sua deteção é baseada na atividade tipo peroxidase da hemoglobina (que catalisa a reação do dihidroperóxido de diisopropilbenzeno e da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) que leva ao desenvolvimento de cores de laranja a verde ou até azul (grandes concentrações) <sup>(11)</sup>.

Falsos positivos podem ser causados pela atividade da peroxidase microbiana, associada a infeções do trato urinário <sup>(11)</sup>.

**Leucócitos**

Amostras de urina normais apresentam geralmente resultados negativos <sup>(11)</sup>.

Um aumento dos leucócitos observa-se em quase todas as doenças dos rins e do trato urinário <sup>(11)</sup>.

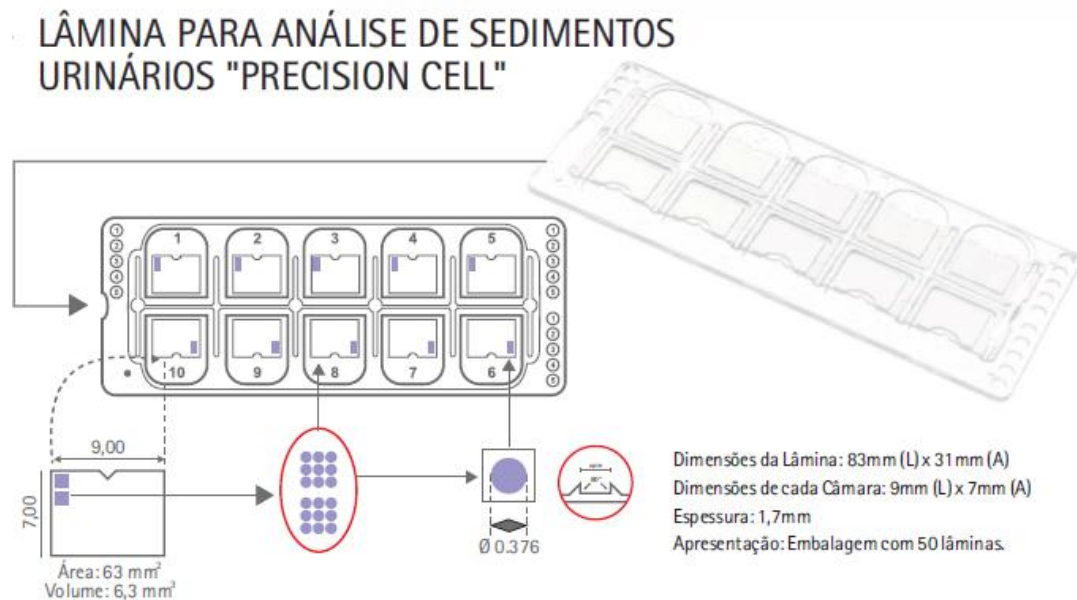
As esterases presentes nos leucócitos granulocíticos catalisam a hidrólise do éster do aminoácido pirrol-derivado, libertando um pirrol que reage com um sal de diazónio, formando um composto púrpura <sup>(11)</sup>.



### 7.1.2. Observação microscópica do sedimento urinário

Este exame é realizado como complementar ao exame sumário caso tal tenha sido solicitado pelo médico prescritor e para todas as urinas assinalados pelo equipamento como fora das especificações pré-definidas (existência de proteínas, sangue ou leucócitos).

As urinas são centrifugadas (1500 rpm / 5 minutos) e decantadas após o que se ressuspende o sedimento e se observa uma gota do mesmo ao microscópio ótico (entre lâmina e lamela ou recorrendo às câmaras para observação de sedimentos) com uma ampliação de 10 e 40.



**Figura 13 – Lâmina “Precision cell” utilizada para observação do sedimento urinário.**

São pesquisados / quantificados os seguintes elementos:

- Células epiteliais;
- Células do trato urinário superior;
- Eritrócitos;
- Leucócitos;
- Cilindros (hialinos, granulosos, eritrocitários, leucocitários, cerosos);
- Cristais (ácido úrico, oxalato de cálcio, fosfato tri-magnésiano, cistina)<sup>(10)</sup>.

Este sedimento é escrito recorrendo a um código interno de 4 dígitos, em que:

O 1º dígito é usado para referir a presença de ácido úrico (neste caso é o 2); de fungos leveduriformes (neste caso é o 3); quando nenhuma das anteriores se verifique é usado o número 1.

O 2º dígito refere-se à presença células epiteliais;

O 3º dígito refere-se à presença de leucócitos;

O 4º dígito refere-se à presença de eritrócitos <sup>(10)</sup>.

O 2º, 3º e 4º dígitos podem ir de 0 a 4, sendo que:

- 0 é usado para referir a ausência do elemento;
- 1 é usado para referir 2 a 5 elementos;
- 2 é usado para referir 5 a 10 elementos;
- 3 é usado para referir 10 a 25 elementos;
- 4 é usado para referir mais de 25 elementos <sup>(10)</sup>.

A observação do sedimento urinário é, ainda, parte integrante de qualquer exame bacteriológico de urina.

### 7.1.3. Teste de gravidez

Trata-se de um teste imunológico por detecção qualitativa da gonadotrofina coriônica humana (hCG) no soro ou urina <sup>(12)</sup>.

A  $\beta$ -hCG é uma hormona produzida pela placenta, constituída por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ . A primeira é comum a outras hormonas como a LH, FSH e TSH, e a segunda específica desta hormona. É utilizada nos testes qualitativos para o diagnóstico da gravidez, visto que os seus níveis são detetáveis 7 a 10 dias após a conceção <sup>(12)</sup>.

Este teste é um ensaio imunocromatográfico do tipo sandwich, que se desenvolve numa membrana de nitrocelulose. A amostra vai migrar ao longo da membrana até atingir o conjugado coloidal anti- $\beta$ -hCG <sup>(12)</sup>.

No caso de uma amostra positiva, a  $\beta$ -hCG vai ser imobilizada em sandwich entre o conjugado e o anticorpo anti- $\beta$ -hCG <sup>(12)</sup>.

A acumulação do complexo imune imobilizado leva ao desenvolvimento de uma linha cor-de-rosa na área da linha teste, indicando que a amostra é positiva para a detecção de  $\beta$ -hCG <sup>(12)</sup>.

Este teste apresenta algumas limitações:

- Pode produzir resultados falsos positivos noutras situações em que existam níveis elevados de hCG - patologias trofoblásticas e tumores testiculares (estes diagnósticos devem ser excluídos ao considerar a possibilidade de gravidez);
- Os níveis de hCG não são diferentes entre uma gravidez normal e uma ectópica;
- Os níveis de hCG podem permanecer detetáveis por várias semanas após parto normal ou por cesariana, aborto espontâneo ou terapêutico;
- Pode produzir resultados falsos negativos na presença de níveis de hCG abaixo do limite de sensibilidade do teste (urina diluída ou gravidez muito recente), logo, em caso de suspeita de gravidez deve ser repetido o teste com nova amostra de soro ou da primeira urina da manhã, após 48-72 horas <sup>(12)</sup>.

#### 7.1.4. Contagem de Addis

É uma medida quantitativa da excreção de eritrócitos, leucócitos e cilindros em amostras de urina de 12 horas, permitindo assim caracterizar valores mais precisos dos elementos anormais presentes na urina (estes podem surgir em quantidades pequenas demais para serem detectados numa amostra de urina aleatória, num exame de rotina), e fazer a monitorização da doença renal <sup>(10)</sup>.

As proteínas excretadas e a densidade da amostra também são determinadas <sup>(10)</sup>.

O procedimento para a contagem é:

- Medir o volume da amostra de urina de 12 horas;
- Homogeneizar e medir 10ml;
- Centrifugar (1500rpm, 5 minutos) e rejeitar o sobrenadante;
- Ressuspender o precipitado ajustando o volume de sedimento obtido, com solução fisiológica (NaCl 0,9%), para 1 a 5 ml, dependendo da quantidade do resíduo visível no fundo do tubo;
- Homogeneizar e colocar na Câmara de Neubauer;
- Contar isoladamente o número de cada elemento nos 9 quadrados de 1mm <sup>(10)</sup>.

O número cada elemento eliminado em 12 horas é obtido aplicando-se a fórmula:

$$N = \frac{S}{v} \times n \times \frac{V}{10}$$

N = nº total de cada elemento no volume total

S = volume no qual o sedimento é diluído

v = volume em que é feita a contagem (0.0009 cm<sup>3</sup>)

n = nº total de cada elemento contado

V = volume total de urina em 12 horas

10 = nº mL de urina centrifugados

São considerados normais os seguintes valores (eliminados em 12 horas):

- Eritrócitos – até 500.000
- Leucócitos – até 1.000.000
- Cilindros – até 5.000

Contagens acima destes valores são verificadas em lesões renais, especialmente na glomerulonefrite, condição na qual esta contagem é de grande valor prognóstico <sup>(10)</sup>.

#### 7.1.5. Contagem minutada

Também designada de contagem Addis-Hamburger é uma técnica usada para o cálculo da concentração de elementos celulares contidos na urina e da quantidade de urina eliminada durante um dado período de tempo, permitindo assim avaliar o débito urinário e indiretamente a integridade da função renal <sup>(10)</sup>.

É realizada em amostras de urina de 3 horas e procede-se de forma semelhante à contagem de Addis <sup>(10)</sup>.

No final os valores obtidos para cada elemento são divididos pelo intervalo de tempo em que a colheita foi realizada, ou seja, 180 minutos <sup>(10)</sup>.

Os resultados são apresentados em nº elemento excretado/minuto <sup>(10)</sup>.

#### 7.1.6. Urina 24 horas

Neste setor apenas se mede o volume final, e caso seja solicitado faz-se um exame sumário da urina <sup>(10)</sup>.

As amostras são depois processadas noutra setor.

### 7.1.7. Exame Bacteriológico

Do exame bacteriológico de urina constam:

- Observação microscópica do sedimento, de modo a avaliar a existência de resposta inflamatória e ainda a procurar a presença de bactérias ou fungos;
- Gram direto da amostra;
- Cultural (inclui sementeira, incubação e leitura) <sup>(10)</sup>.

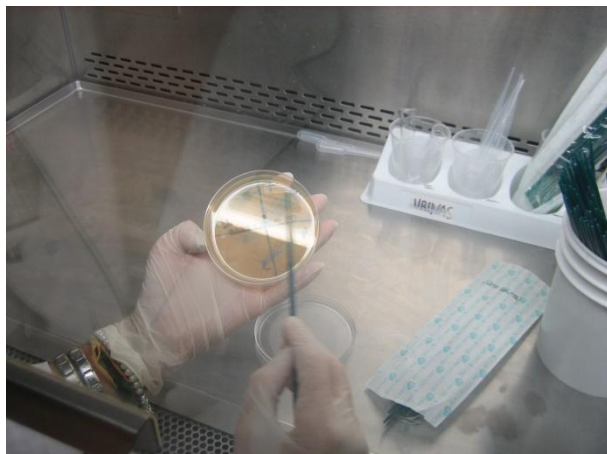
Semeamos a urina no quadrante da placa de CPS, por esgotamento, usando uma ansa descartável de 1 $\mu$ L (o que irá permitir a valorização da contagem de colónias) e incubamos a placa durante 24h a 35-37°C.



**Figura 14 – Após agitar o frasco de urina, remove-se a tampa.**



**Figura 15 – Inserimos a ansa descartável na urina.**



**Figura 16 – Semeamos a urina num quadrante do meio CPS.**



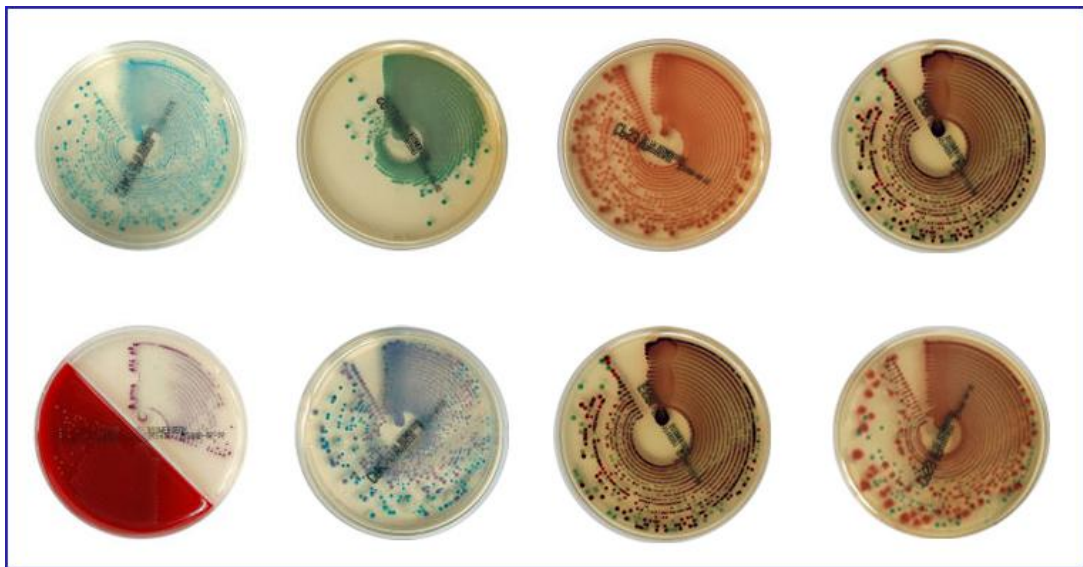
**Figura 17 – Os meios de cultura são colocados na estufa.**

De forma a permitir economizar material, as placas de CPS são divididas em 4 com um marcador e cada quadrante é numerado (a azul ou verde, de acordo com o circuito já descrito).

A gelose CPS3 é um meio cromogénico de isolamento e identificação dos microrganismos patogénicos urinários <sup>(13)</sup>.

A utilização deste meio permite:

- Isolar colónias e facilmente identificá-las e distingui-las com cores diferenciadas;
- Identificar culturas mistas;
- Efetuar a contagem microbiana mediante um método de sementeira padronizado;
- Poupar tempo uma vez que é muito prático e diminui o número de testes a realizar <sup>(13)</sup>.



**Figura 18 – Gelose CPS3 com crescimento de diferentes microrganismos, em que é evidente o fato de ser um meio cromogénico.**

A nova geração de CPS ID3 aumentou:

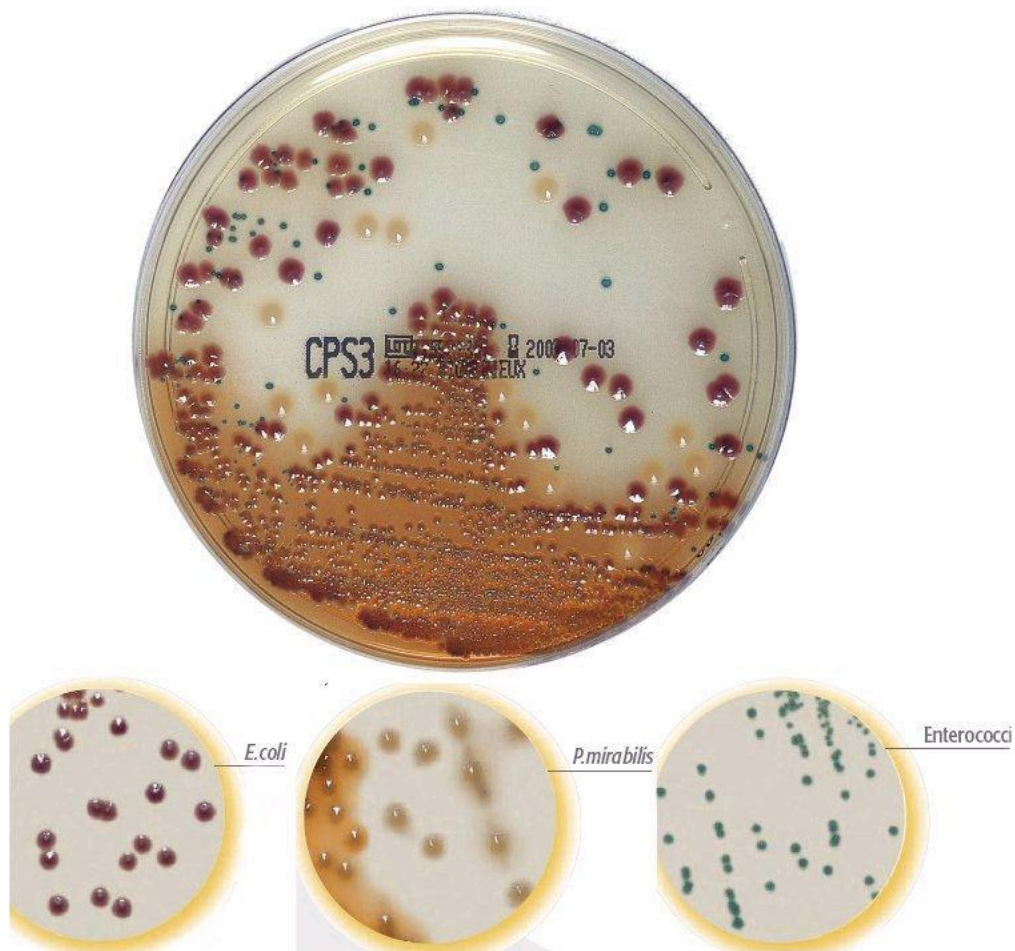
- Capacidade nutricional, principalmente para estafilococos e leveduras;
- Sensibilidade de deteção e especificidade de coloração para os principais microrganismos normalmente encontrados na urina;
- A atividade  $\beta$ -glucosidase permitindo a identificação do grupo bacteriano KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*) com maior intensidade de cor <sup>(13)</sup>.

Este meio permite orientar a identificação de *Streptococcus agalactiae*, *Candida Albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* <sup>(13)</sup>.



O CPS ID3 contém substratos específicos das atividades enzimáticas a detetar, permitindo a imediata identificação dos seguintes grupos:

- *Escherichia coli* - coloração espontânea rosa a vermelho escuro das estirpes produtoras de  $\beta$ -glucuronidase (não é necessário realizar o teste do indol);
- *Enterococcus* - coloração espontânea turquesa das estirpes que expressam  $\beta$ -glucosidase;
- *KESC* (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*) - coloração espontânea verde a castanho-esverdeado das estirpes que expressam  $\beta$ -glucosidase;
- *Proteeae* (*Proteus*, *Providencia* e *Morganella*) - coloração espontânea castanho-escuro das estirpes que expressam desaminase (não é necessário realizar a pesquisa de triptofano desaminase-TDA) <sup>(13)</sup>.



**Figura 19 – Meio de cultura CPS3, com diferentes microrganismos isolados.**

Interpretação das placas incubadas:

- Se a urina não tiver crescimento em placa
- Se o crescimento for inferior a  $10^3$  UFC (unidades formadoras de colónias) /mL



**Figura 20 – Crescimento em placa inferior a  $10^3$  UFC/mL.**

- Se tiver uma flora contaminante (mais do que um microrganismo) e/ou crescimento inferior ou igual a  $10^4$  UFC/mL



**Figura 21 e 22- Meio de cultura com flora contaminante e crescimento inferior a  $10^4$  UFC/mL.**



Conclusão do exame bacteriológico

(excepto se houver contexto clínico que implique a sua valorização)

- Se a urina tiver crescimento igual ou superior a  $10^5$  UFC/mL procede-se à identificação da bactéria isolada e ao respetivo teste de suscetibilidade aos quimioterápicos (TSQ; também pode ser designado de TSA- Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos) de acordo com o protocolo descrito à frente.



**Figura 23 – Crescimento em placa igual ou superior a  $10^5$  UFC/mL.**

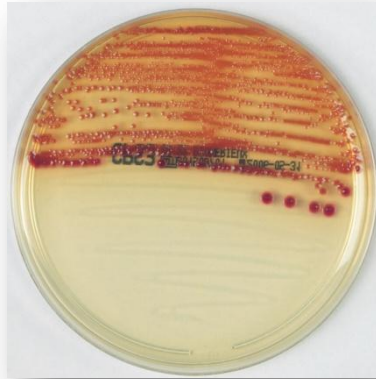
No caso do sedimento urinário não estar de acordo com o crescimento em placa procede-se da seguinte forma:

- Se o sedimento tiver muitos leucócitos e não existir crescimento na placa coloca-se a placa a incubar mais 24h na estufa e efetua-se uma coloração de Ziehl desse sedimento para pesquisa de BAAR (bacilos álcool - ácido resistentes);
- Se há grande crescimento em placa e o sedimento não corresponde, confirma-se o sedimento observado, retificando-se se necessário o resultado obtido, prosseguindo-se com a Identificação e TSA.

## Identificação e TSA

### Protocolo de identificação

#### 1. Colónias identificáveis em CPS ID3:

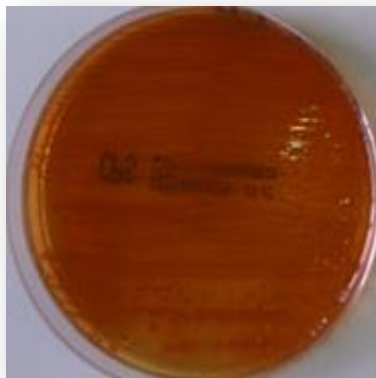


#### *Escherichia coli*

Colónias de cor rosa a vermelha escura ou translúcidas com centro rosa/vermelho.

Não é necessário realizar o teste de indol.

**Figura 24- Isolamento de *Escherichia coli* em CPS3.**



Coloração castanho-escuro ou claro das colónias ou do tapete bacteriano.



Efetuar pesquisa do indol

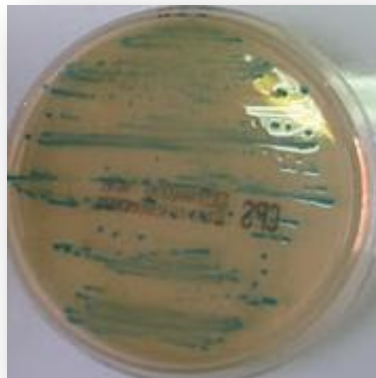
- Indol (+) – *Proteus* indologénico, *Providencia* ou *Morganella*

Utilizar o painel NUC 52 (identificação e TSA).

- Indol (-) – *Proteus mirabilis*

Utilizar o painel NUC 52 (identificação e TSA).

**Figura 25 – Isolamento de *Proteus mirabilis*, *Proteus* indologénico, *Providencia* ou *Morganella* em CPS3.**

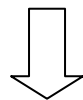
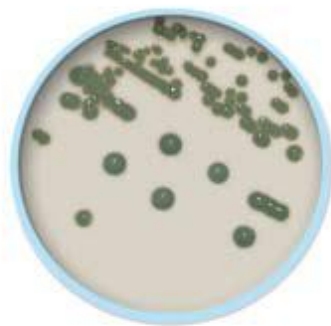


*Enterococcus spp.*

Colónias turquesa que se confirmem ser cocos Gram positivo no exame direto.

Utilizar o painel PC 32 (identificação e TSA).

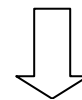
**Figura 26 – Isolamento de *Enterococcus spp.* em CPS3.**



*Klebsiella pneumoniae*

Colónias verde-acastanhado que se confirmem ser bacilos Gram negativo no exame direto.

Utilizar o painel NUC52 (identificação e TSA).



*Pseudomonas aeruginosa*

Colónias pigmentadas que no exame direto se confirmem ser bacilos móveis.

Oxidase +

Utilizar o painel NUC54 (identificação e TSA).

**Figura 27 e 28 – Isolamento de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* em CPS3.**



*Streptococcus agalactiae*

Normalmente colónias de cor violeta são presuntivas desta espécie.

Completar a identificação com o painel PC32 (identificação e TSA).

**Figura 29 – Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em CPS3.**



*Candida albicans*

Colónias brancas que no exame direto se confirmem ser leveduras.

Completar a identificação realizando a prova da filamentação ou do tubo germinativo – capacidade de formar filamento na presença de soro humano (pode usar-se também soro bovino, de cavalo ou coelho), após incubação a 37°C durante período máximo de 2 a 3 horas.

**Figura 30 – Isolamento de *Candida albicans* em CPS3.**



*Staphylococcus aureus*

Identificação imediata com:

- Normalmente colónias amarelas
- Cocos no exame direto
- Catalase +
- Confirmar com o teste de aglutinação em látex

Para realizar o TSA utiliza-se o painel PM21.

**Figura 31 – Isolamento de *Staphylococcus aureus* em CPS3.**



2. Colónias não identificáveis imediatamente - é realizada uma coloração de Gram e testes bioquímicos.



**Figura 32 – Bacilos Gram negativo observados ao microscópio ótico.**

Bacilos Gram Negativo



Teste da Oxidase

- Oxidase (-)

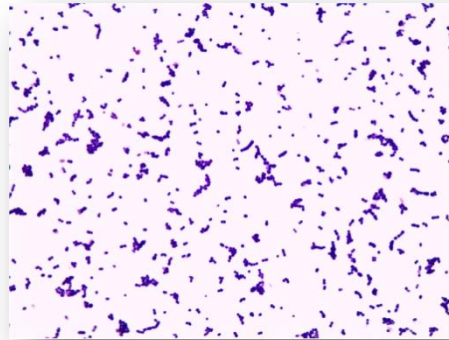
*Enterobacteriaceae*

Utilizar o painel NUC52  
(identificação e TSA)

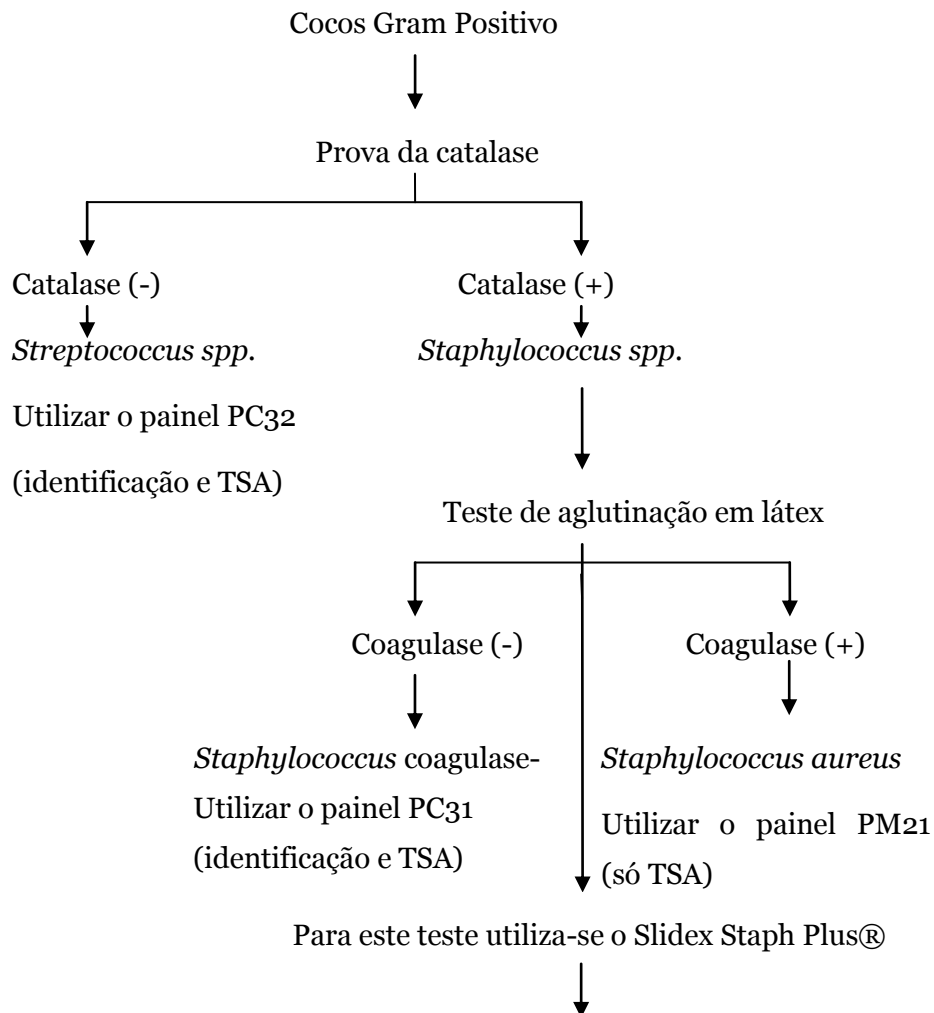
- Oxidase (+)

Não *Enterobacteriaceae*

Utilizar o painel NUC54  
(identificação e TSA)



**Figura 33- Cocos Gram positivo observados ao microscópio ótico.**



Baseia-se num sistema de deteção tripla: partículas azuis de látex, sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos monoclonais detetam simultaneamente o fator clumping (fator de afinidade), a proteína A e os antígenos específicos de grupo presentes na cápsula do *Staphylococcus aureus*.<sup>(14)</sup>



O aparelho utilizado é o MicroScan WalkAway 96 da Siemens®.



**Figura 34 – Aparelho da Siemens MicroScan WalkAway 96.**

Equipamento totalmente automatizado para microbiologia clínica, que incuba automaticamente a suspensão bacteriana por um período de tempo apropriado, adiciona reagentes e executa a leitura dos painéis <sup>(15)</sup>.

Especifica com segurança a identificação e a suscetibilidade antimicrobiana (com concentração inibitória mínima), numa ampla variedade de antibióticos <sup>(15)</sup>.

Apresenta uma dupla metodologia:

- A metodologia colorimétrica (espectrofotómetro modificado com seis comprimentos de onda e fibras óticas) é usada para a leitura dos painéis cromogénicos convencionais e painéis rápidos cromogénicos;
- A metodologia fluorimétrica (fluorómetro) é usada para a leitura dos Painéis Rápidos Fluorogénicos <sup>(15)</sup>.

Tem capacidade de processar simultaneamente 96 painéis <sup>(15)</sup>.

Do equipamento faz parte um computador capaz de armazenar todos os registos dos pacientes e das identificações e suscetibilidade antimicrobiana <sup>(15)</sup>.

Procedimento para a identificação e TSA

P  
R  
E  
P  
A  
R  
A  
Ç  
Ã  
O  
  
D  
O  
  
I  
N  
Ó  
C  
U  
L  
O



Segurar na ansa Prompt de forma perpendicular à superfície do ágar e tocar em três colónias isoladas com a ponta.



Retirar o excesso de colónias (removendo um colarinho da ansa) e introduzir a ansa na garrafa.



Agitar vigorosamente a garrafa para criar uma suspensão da bactéria nos 30 mL de água Pluronic-D.



Verter a suspensão para uma piscina ou tabuleiro.

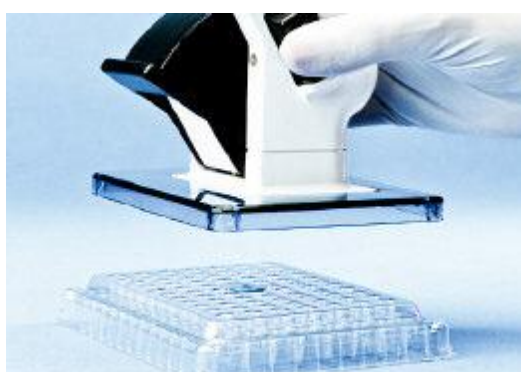
P  
R  
E  
P  
A  
R  
A  
Ç  
Ã  
O  
D  
O  
P  
A  
I  
N  
E  
L



Posicionador o inoculador do sistema RENOK na piscina. Pressionar o botão central para encher de inóculo os poços do tabuleiro de transferência.



Posicionar o tabuleiro de transferência no painel do MicroScan (já identificado com um código de barras da amostra) e pressionar o botão para libertar o inóculo para os poços do painel.



Remover o tabuleiro de transferência, posicioná-lo novamente na piscina e apertar os botões laterais para libertar o inoculador.



Tapar o painel e introduzi-lo no aparelho com o código de barras virado para o sensor.

**Figura 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 – Preparação do inóculo e do painel.**

## 7.2. Fezes

### 7.2.1. Exame Parasitológico

Antes da preparação da amostra é essencial ter em atenção a eventual presença de estruturas macroscópicas sugestivas de parasitas (identificando-as sempre que possível) <sup>(16)</sup>.

A amostra é preparada por concentração pelo método de Ritchie, que é rápido, fácil de ser executado e muito sensível. Baseia-se no processo de centrifugação/sedimentação das formas parasitárias num sistema de formol e éter <sup>(16)</sup>.

Atualmente é utilizado o Kit comercial IBERKIT® para a concentração de amostras de fezes, método também baseado no princípio da sedimentação <sup>(17)</sup>.

Posteriormente faz-se a observação ao microscópio ótico com ampliação de 10x e 40x, depois de homogeneizar a suspensão. Adiciona-se uma gota de Lugol sempre que se torne útil para facilitar a visualização de certas estruturas <sup>(16)</sup>.

Os parasitas encontrados foram (exame microscópico): quistos de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba coli*, ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e de *Taenia spp.*

### 7.2.2. Exame Bacteriológico

#### Fezes Moldadas

Técnica de sementeira:

- 1<sup>a</sup> sementeira diretamente da amostra para 4 meios de cultura e um meio de enriquecimento;
- 2<sup>a</sup> sementeira, 4 a 6h depois, passando com ansa calibrada de 1μL, do meio de enriquecimento para os meios de cultura <sup>(16)</sup>.

Meios de cultura:

- 1) SS – Agar Salmonella Shigella é um meio seletivo para diferenciação, utilizado no isolamento de bacilos entéricos patogénicos <sup>(18)</sup>.

Este meio é utilizado para o isolamento primário de *Salmonella* proveniente de amostras de fezes humanas <sup>(18)</sup>.

Uma vez que existem meios mais eficientes para o isolamento de *Shigella*, não é utilizado para o isolamento deste microrganismo.

Inibe o crescimento dos microrganismos Gram positivo e outras *Enterobacteriaceae* que não a *Salmonella* e a *Shigella*, devido ao seu teor de sais biliares, verde brilhante, tiosulfato de sódio e citrato <sup>(18)</sup>.

A diferenciação de organismos entéricos consegue-se através da incorporação de lactose no meio:

- Os organismos que fermentam a lactose produzem ácido que, na presença do indicador vermelho neutro, resulta na formação de colónias vermelhas;
- Os organismos não fermentadores da lactose formam colónias incolores (maioria dos elementos patogénicos intestinais, incluindo *Salmonella* e *Shigella*) <sup>(18)</sup>.

O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem detetar a produção de sulfureto de hidrogénio (como se evidencia pelas colónias com centros pretos) <sup>(18)</sup>.

2) XLD - Agar desoxicolato-lisina-xilose é um meio para diferenciação, moderadamente seletivo, utilizado para o isolamento e diferenciação de elementos patogénicos entéricos Gram negativo (*Salmonella* e *Shigella*)<sup>(19)</sup>.

É especialmente adequado para o isolamento de espécies de *Shigella*<sup>(19)</sup>.

Permite diferenciar os elementos patogénicos não só dos organismos fermentadores de lactose não patogénicos, mas também de muitos elementos não patogénicos que não fermentam a lactose nem a sacarose<sup>(19)</sup>.

Utiliza o desoxicolato de sódio como agente seletivo e, por isso, possui uma ação inibitória em relação aos microrganismos Gram positivo<sup>(19)</sup>.

A xilose é incorporada no meio uma vez que é fermentada por praticamente todos os elementos entéricos, excepto pelas *Shigellae*, e esta característica permite a diferenciação das espécies de *Shigella*<sup>(19)</sup>.

A lisina é incluída de modo a permitir que o grupo de *Salmonella* seja diferenciado dos elementos não patogénicos uma vez que, sem a lisina, as salmonelas rapidamente fermentariam a xilose, tornando-se impossível distingui-las das espécies não patogénicas. Depois das salmonelas terem acabado com a fonte de xilose, a lisina é atacada através da enzima lisina descarboxilase, revertendo a um pH alcalino que imita a reação da *Shigella*. De modo a evitar que se dê uma inversão deste tipo por coliformes positivos à lisina, adiciona-se lactose e sacarose para produzir ácido em excesso<sup>(19)</sup>.

O meio possui ainda tiosulfato de sódio e citrato de amónia férrico, para a visualização do sulfureto de hidrogénio produzido, resultando na formação de colónias com centros pretos. Os microrganismos produtores de H<sub>2</sub>S não patogénicos não descarboxilam a lisina, assim, a reação ácida que produzem impede que as colónias se tornem negras (isto só acontece com pH neutro ou alcalino)<sup>(19)</sup>.

3) Agar de Sorbitol MacConkey - é um meio parcialmente seletivo para diferenciação, utilizado no isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 proveniente de fontes clínicas, veterinárias, alimentares e ambientais <sup>(20)</sup>.

A *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 foi reconhecida pela primeira vez como um agente patogénico para o homem em 1982, e está envolvida em casos de diarreia e colite enterohemorrágica grave <sup>(21)</sup>.

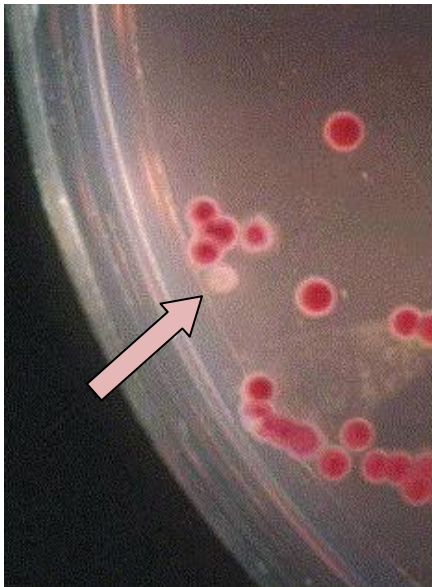
Normalmente esta estirpe é diferente das estirpes normais de *Escherichia coli* uma vez que é negativa ao sorbitol e à  $\beta$ -glucuronidase. Por esta razão, é possível diferenciá-la por métodos bioquímicos quando os substratos apropriados são incluídos em meios bacteriológicos <sup>(20)</sup>.

Como fonte de nitrogénio são incorporadas peptonas no meio <sup>(20)</sup>.

Este meio utiliza D-sorbitol (hidrato de carbono fermentável) em vez de lactose, e a maioria das estirpes de *Escherichia coli* hemorrágica, não fermentam o D-sorbitol, surgindo como colónias incolores no agar de sorbitol MacConkey <sup>(20)</sup>.

Os sais biliare e o cristal violeta são agentes seletivos que inibem o desenvolvimento de microrganismos Gram positivo <sup>(20)</sup>.

O vermelho neutro é um indicador de pH <sup>(20)</sup>.



**Figura 43 – Colónias de *Escherichia coli* O157:H7 (apontadas) não fermentam o sorbitol, surgindo como colónias incolores no meio de sorbitol MacConkey.**

4) Meio agar MacConkey - utilizado para o isolamento e diferenciação de bactérias Gram negativo que também permite avaliar a fermentação da lactose. Colónias bacterianas que fermentam a lactose tornam o meio rosa choque e as bactérias que não são fermentadoras de lactose tornam o meio amarelo claro <sup>(22)</sup>.

Meio parcialmente seletivo pois contém cristal de violeta e sais biliares que inibem o crescimento de microrganismos Gram positivo <sup>(22)</sup>.

5) Meio de enriquecimento: Caldo Gram Negativo (GN) é recomendado para a recuperação de *Salmonella* e *Shigella* <sup>(23)</sup>.

O citrato de sódio e o desoxicolato de sódio inibem o crescimento de microrganismos Gram positivo e de algumas bactérias coliformes Gram negativo <sup>(23)</sup>.

Os fosfatos funcionam como tampão e o cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico <sup>(23)</sup>.

A alta concentração de manitol e o excesso de dextrose limitam o crescimento de *Proteus* e aumentam o crescimento da *Salmonella* e *Shigella*, pela fermentação do manitol <sup>(23)</sup>.

Tempo de incubação: 4 a 6h para a 1ª sementeira mais 24h depois da 2ª sementeira.

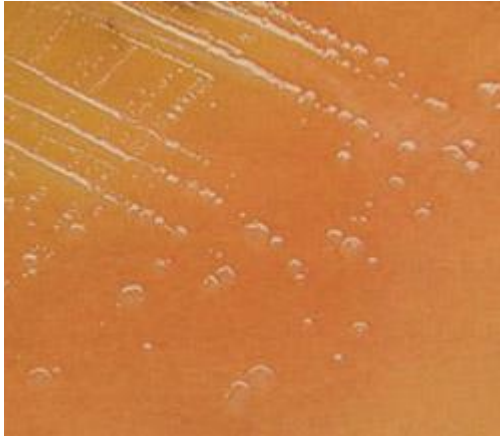
Condições de incubação: em estufa a 35-37°C <sup>(23)</sup>.

A leitura das placas é feita no dia seguinte, só sendo valorizadas as placas com colónias suspeitas. Nesses casos, efetua-se a identificação das colónias suspeitas (recorrendo aos painéis NID2 - Negative identification) <sup>(16)</sup>.

No caso de se identificar um agente patogénico das fezes (como *Salmonella* ou *Shigella*) efetua-se também o respetivo antibiograma (utilizamos painel NM37) <sup>(16)</sup>.



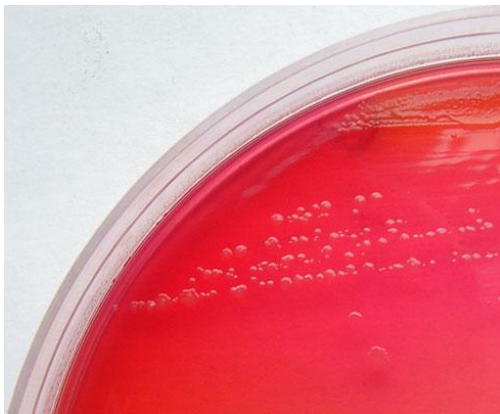
Resultados para *Shigella*:



Meio SS

Colónias transparentes, translúcidas ou opacas, lisas.

As colónias de microrganismos fermentadores da lactose são vermelhas e mucoides.



Meio XLD

Colónias transparentes, da mesma cor do meio.

Uma vez que não fermenta a xilose, lactose e sacarose, o indicador vermelho de fenol não altera a cor.

Também não descarboxila a lisina, logo não se produz uma cor vermelha em redor das colónias, pois não há produção de cadaverina.

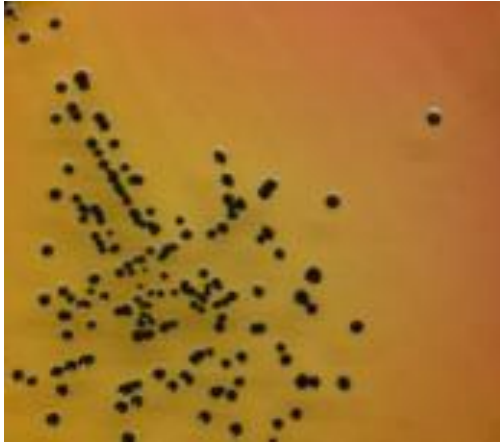


Meio MacConkey

Colónias incolores e transparentes (os microrganismos fermentadores da lactose surgem como colónias avermelhadas).

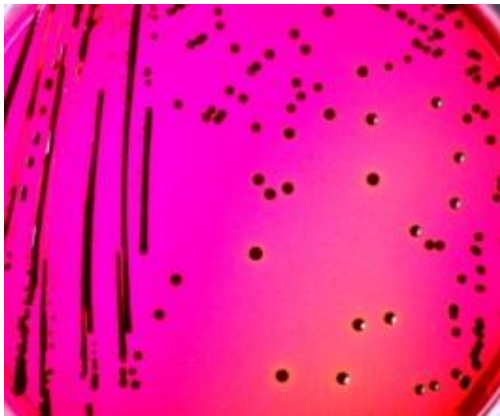
**Figura 44, 45 e 46 – Isolamento de *Shigella* nos diferentes meios de cultura usados.**

Resultados para *Salmonella*:



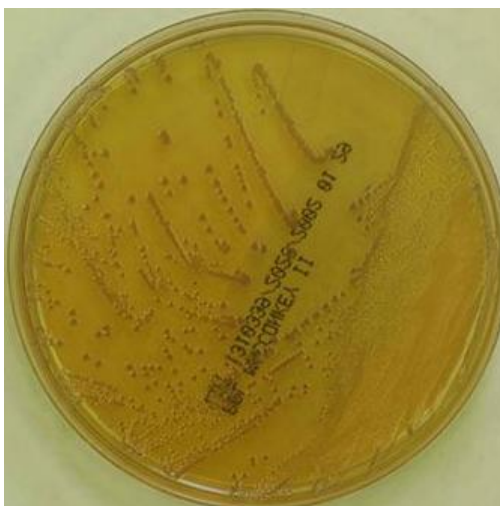
Meio SS

Colónias transparentes, com o centro negro devido à produção de H<sub>2</sub>S.



Meio XLD

Colónias vermelhas com o centro negro.



Meio MacConkey

Colónias incolores e transparentes.

**Figura 47, 48 e 49 - Isolamento de *Salmonella* nos diferentes meios de cultura usados.**

Fezes Diarreicas ou com pedido específico

Além do descrito para as fezes moldadas, introduzem-se meios de cultura específicos/diferenciais para *Campylobacter* e *Yersinia* <sup>(16)</sup>.

- Meio seletivo *Yersinia*

Tornado seletivo pela inclusão de desoxicolato de sódio, cristal de violeta e alguns agentes antimicrobianos, permitindo assim a inibição seletiva de microrganismos Gram positivo e Gram-negativo <sup>(24)</sup>.

As peptonas presentes no meio fornecem os nutrientes <sup>(24)</sup>.

A fermentação do manitol presente no meio, na presença de vermelho neutro, resulta numa colónia característica "olho-de-boi" de *Yersinia spp.* (colónia incolor com centro vermelho) <sup>(24)</sup>.



**Figura 50 – Isolamento de *Yersinia spp.* que fermenta o manitol presente no meio, e as colónias adquirem uma aparência de olho de boi (parte central da colónia vermelha).**

- Meio seletivo *Campylobacter*

O agar para *Campylobacter* com cinco agentes antimicrobianos e sangue de ovelha a 10% é recomendado como um meio seletivo para o isolamento e crescimento de *Campylobacter jejuni* de amostras fecais humanas <sup>(25)</sup>.

Este meio suporta o crescimento de espécies de *Campylobacter* devido ao seu teor de peptonas, dextrose, extrato de levedura e sangue <sup>(25)</sup>.

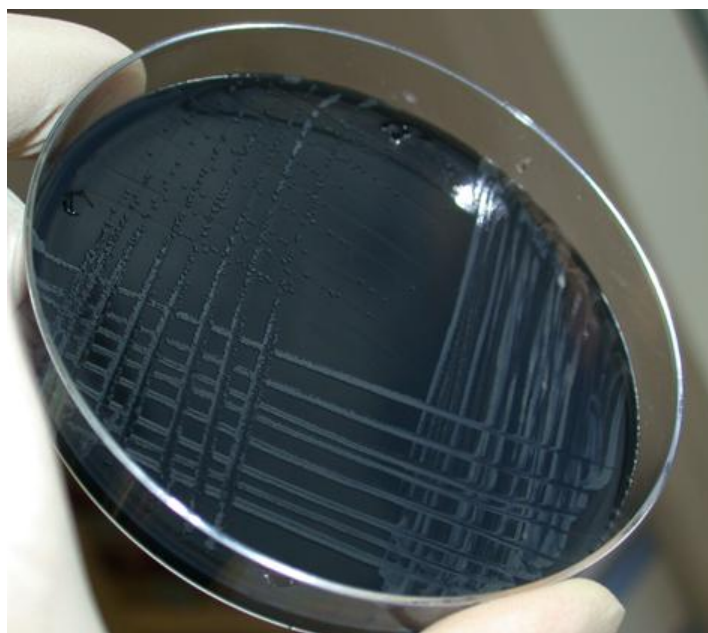
Permite assim o crescimento de *Campylobacter jejuni*, que produz colónias cinzentas, planas e húmidas, após incubação a 42°C, em microaerobiose (48-96horas) <sup>(16)</sup>.

As peptonas fornecem compostos de nitrogénio, carbono e enxofre <sup>(25)</sup>.

O extrato de levedura é uma fonte de vitamina B <sup>(25)</sup>.

O sangue de ovelha fornece nutrientes adicionais <sup>(25)</sup>.

A incorporação de agentes antimicrobianos (anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprim e vancomicina) suprime o crescimento da flora microbiana normal nas amostras fecais, facilitando assim o isolamento de *Campylobacter jejuni* e outras espécies de *Campylobacter* resistentes à cefalotina como por exemplo, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*. É por isso necessária a realização de testes bioquímicos para uma completa identificação <sup>(25)</sup>.



**Figura 51 – Colónias de *Campylobacter jejuni* no meio seletivo *Campylobacter*.**

### 7.2.3. Pesquisa de sangue oculto

Este teste é usado para detetar indícios de distúrbios gastrointestinais (como cancro do cólon) e é realizado com o dispositivo NADAL®FOB que é um teste rápido de visualização imunocromatográfica para a deteção qualitativa da hemoglobina humana <sup>(26)</sup>.

A amostra de fezes que contém hemoglobina reage com anticorpos monoclonais específicos que estão acoplados a partículas de ouro. Este complexo espalha-se pela membrana e alcança a linha de teste, que está pré-revestida por anticorpos anti-hemoglobina <sup>(26)</sup>.

Numa amostra positiva, as moléculas de hemoglobina, carregadas com os anticorpos marcados com ouro, ficam visíveis na linha teste por adquirirem uma coloração rosa. Numa amostra negativa, devido à ausência de moléculas de hemoglobina, não surge coloração na zona teste. Em ambos os casos na zona de controlo deve aparecer sempre uma banda colorida, como indicador do bom desempenho do teste e do dispositivo <sup>(26)</sup>.

### 7.2.4. Grau de digestão das fezes

O estudo do grau de digestão das fezes permite apreciar o estado da função digestiva e rapidez do trânsito intestinal <sup>(16)</sup>.

As fezes deverão ser avaliadas em relação aos caracteres físicos (consistência, forma, cheiro, cor e pH) e no exame macroscópico devem-se pesquisar elementos anormais (muco, sangue, pús, parasitas) <sup>(16)</sup>.

Para o exame microscópico, depois das fezes bem homogeneizadas suspende-se um pouco de amostra em soro fisiológico. Observam-se 2 gotas da suspensão, uma corada com Lugol e outra não corada <sup>(16)</sup>.

Proceder ao reconhecimento dos seguintes elementos:

- Resíduos alimentares de origem animal (fibras musculares, gotículas de gordura);
- Resíduos alimentares de origem vegetal (grãos de amido, cristais, celulose);
- Substâncias de origem intestinal (muco, leucócitos, hemácias e células epiteliais) <sup>(16)</sup>.

Durante o meu estágio não realizei nenhum estudo destes.

### 7.3. Expetoração

#### 7.3.1. Pesquisa de BAAR

Efetua-se o esfregaço da amostra em duas lâminas (escolher a zona mais purulenta da amostra e retirar com uma ansa de 1 $\mu$ L) previamente marcadas com uma etiqueta. Nesta deve constar o número do processo e a amostra <sup>(27)</sup>.

As lâminas devem ser fixadas pela chama e colocadas no suporte apropriado (“Gram” ou “Ziehl”) para serem posteriormente coradas e observadas ao microscópio ótico <sup>(27)</sup>.

#### Coloração de Gram

- Cobrir os esfregaços com Cristal Violeta durante 20-30 segundos;
- Lavar as lâminas com água da torneira;
- Cobrir as lâminas com Lugol deixando atuar 40-60 segundos;
- Lavar com água da torneira;
- Cobrir as lâminas com a solução de descoloração;
- Deixar atuar cerca de 15 segundos e lavar de imediato com água da torneira;
- Repetir este passo mais 2 ou 3 vezes e lavar com água da torneira;
- Cobrir as lâminas com o corante de contraste (Safranina) durante 15-30 segundos;
- Lavar com água da torneira e deixar secar ao ar <sup>(27)</sup>.

#### Coloração de Ziehl-Neelsen / método de Kinyoun modificado (microscopia ótica):

- Cobrir os esfregaços com Fucsina Fenicada durante 5 minutos;
- Lavar com água da torneira;
- Cobrir as lâminas com álcool - ácido durante 3 minutos;
- Lavar com água da torneira;
- Cobrir com Azul-de-metileno deixando atuar 3 minutos;
- Lavar com água da torneira e deixar secar ao ar <sup>(27)</sup>.

### 7.3.2. Exame Bacteriológico + Exame Micológico

Todo o exame deve ser efectuado a partir da porção mais mucosa / purulenta da amostra <sup>(27)</sup>.

Critérios para a rejeição/aceitação de amostras de expetoração para o exame bacteriológico (observação do Gram):

- > 25 células epiteliais (independentemente do n.º de neutrófilos) - amostra imprópria (deve ser pedida nova amostra);
- 10-25 células epiteliais / > 25 neutrófilos - semear (ressalvar);
- <25 células epiteliais (independentemente do n.º de neutrófilos) -semear;
- > 25 neutrófilos - semear <sup>(27)</sup>.

Os meios utilizados para a sementeira são:

- Gelose de chocolate PolyViteX (PVX) que é um meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes, tais como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae* <sup>(28)</sup>;
- Gelose Columbia com 5% sangue de carneiro (COS) que é um meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. Quando se lhe adiciona sangue de carneiro, torna-se um meio nutritivo muito rico adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do seu metabolismo <sup>(29)</sup>;
- Outro (s) que a observação do Gram possa sugerir ao operador (MacConkey ou Sabouraud em caso de suspeita de uma infecção fúngica) <sup>(27)</sup>.

A valorização do crescimento bacteriano deve ter em atenção a contaminação inerente à passagem da expetoração pelo trato respiratório superior com consequente contaminação pela flora normal desta região <sup>(27)</sup>.

Quando aplicável, procede-se à identificação da bactéria isolada e ao TSA <sup>(27)</sup>.

Os microrganismos mais frequentemente implicados em infeções das vias respiratórias inferiores detectados no decorrer do estágio foram:

- *Streptococcus pneumoniae* (utilização do teste de suscetibilidade à optoquina);
- *Haemophilus influenzae*;
- *Klebsiella pneumoniae*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Pseudomonas spp.*

### 7.3.3. Exame Cultural em Lowenstein

As amostras (o processamento é o mesmo independentemente da amostra a analisar) são processadas da seguinte forma:

- Transferir a amostra para um tubo de centrífuga e juntar igual volume de uma solução de KOH 1M;
- Repousar na estufa a 35°C durante 20 minutos;
- Retirar da estufa e adicionar o dobro do volume de H<sub>2</sub>O esterilizada;
- Centrifugar a 3000rpm durante 20 minutos;
- Rejeitar o sobrenadante e adicionar 1 gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 4%;
- Misturar e inocular nos tubos previamente marcados <sup>(30)</sup>.

Os tubos são incubados até 60 dias na estufa a 32°C e são observados todas as semanas <sup>(30)</sup>.

Sempre que se observe crescimento suspeito em algum deles efetua-se uma lâmina corada segundo o protocolo da coloração de Ziehl <sup>(30)</sup>.

Se algum deles for positivo e o crescimento for suficiente, o tubo é enviado para o Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Vila Nova de Gaia onde se procede à identificação da bactéria e respetivo antibiograma <sup>(30)</sup>.

Se o tubo não apresentar crescimento suficiente ou o “Ziehl” for negativo mantém-se na estufa até 60 dias, sendo inserido o resultado de “Negativo aos 30 dias” no fim do 1º mês, e “Negativo aos 60 dias” ao fim do 2º mês (resultado final) <sup>(30)</sup>.



#### 7.4. Exsudado faríngeo

Usado para a deteção de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo A de Lancefield.

A sementeira é feita em:

- COS (gelose Columbia + 5% sangue de carneiro)

A gelose Columbia é um meio de isolamento que se destina a facilitar o crescimento de microrganismos exigentes. Quando se lhe adiciona sangue de carneiro, torna-se um meio nutritivo muito rico, adaptado ao crescimento da maioria das espécies bacterianas, independentemente do seu metabolismo <sup>(29)</sup>.

A gelose contém uma mistura de peptonas especialmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (como os estreptococos) <sup>(29)</sup>.

A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana <sup>(29)</sup>.

Esta gelose também é adequada para o isolamento dos germes anaeróbios <sup>(29)</sup>.

- PVX (gelose de chocolate PolyViteX)

É um meio de isolamento que se destina mais particularmente ao crescimento das estirpes exigentes - *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae* <sup>(28)</sup>.

Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina e pelo PolyViteX <sup>(28)</sup>.

Incubação a 35-37°C, em atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.

As colónias com  $\beta$  Hemólise podem ser repicadas para um meio de gelose de sangue no qual é aplicado um disco impregnado com bacitracina 0,04U (ao qual as bactérias a ser pesquisadas - *Streptococcus pyogenes* – são suscetíveis).

As colónias suspeitas são identificadas recorrendo ao painel PC32.

## **7.5. Exsudado nasal**

### **7.5.1. Pesquisa de Eosinófilos**

Coloração de uma lâmina contendo o exsudado nasal pela coloração de Leishman (coloração utilizada no departamento de Hematologia para os esfregaços de sangue periférico) <sup>(31)</sup>.

Observação ao microscópio ótico (objetiva de imersão) para pesquisa de eosinófilos (leucócitos polimorfonucleares) <sup>(31)</sup>.

Não realizei nenhuma pesquisa durante o meu estágio.

### **7.5.2. Exame Bacteriológico**

Sementeira em COS e PVX <sup>(31)</sup>.

Incubação a 35-37°C, em atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas <sup>(31)</sup>.

Usado essencialmente para fins epidemiológicos, no rastreio de portadores de *Staphylococcus aureus*.

Pode proceder-se à confirmação da identificação de colónias suspeitas, recorrendo ao teste de aglutinação em látex (já descrito).

Quando aplicável é realizado o TSA recorrendo ao painel PM21.

## **7.6. Exsudado nasofaríngeo**

Usado para a deteção de portadores de *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A.

O procedimento é semelhante ao descrito para o exsudado faríngeo.

## 7.7. Sémen

### 7.7.1. Espermograma

À sua chegada as amostras são imediatamente introduzidas na estufa a 35-37°C e é contabilizado o tempo de liquefação do esperma (1.º parâmetro analisado) <sup>(32)</sup>.

Seguidamente são executadas as seguintes determinações:

- Volume;
- pH (tiras);
- Mobilidade após 30 minutos (observação ao microscópio ótico de gota entre lâmina e lamela);
- Contagem do número de espermatozoides, com pesquisa e quantificação de formas anormais (em câmara de Neubauer, após diluição da amostra) <sup>(32)</sup>.

### 7.7.2. Espermocultura - Exame Bacteriológico + Exame Micológico

Como para todas as amostras biológicas para as quais é solicitado exame bacteriológico, realiza-se um Gram direto <sup>(33)</sup>.

As amostras são semeadas em:

- PVX;
- COS;
- MacConkey - é um meio de cultura destinado ao crescimento de bactérias Gram negativo e a indicar a fermentação de lactose. Colónias bacterianas que fermentam a lactose tornam o meio rosa choque e as bactérias que não são fermentadoras de lactose tornam o meio amarelo claro <sup>(22)</sup>;
- Manitol - é um meio seletivo para a deteção de estafilococos em espécies humanas e orientação da identificação de *Staphylococcus aureus*. Possui um indicador de pH que provoca mudança da cor do meio quando o manitol é fermentado, levando à produção de ácido. Os microrganismos que fermentam o manitol produzem colónias amarelas e esta característica é um critério para orientar a identificação de *S. aureus*. O alto teor de cloreto de sódio no meio (7,5%) limita o crescimento de outras bactérias sem ser *Staphylococcus* <sup>(34)</sup>.

- Sabouraud - é um meio seletivo recomendado para o isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras polimicrobianas. Tem uma elevada quantidade de fonte de carbono, ótimo para fungos, visto eles serem heterotróficos, e também contém uma fonte de azoto. O pH da gelose, entre 5 e 5,6, favorece mais o crescimento de fungos e dificulta o crescimento às bactérias, mas não o impede <sup>(35)</sup>.
- Tubo de Tioglicolato <sup>(36)</sup> - é usado para determinar a presença de anaeróbios obrigatórios <sup>(33)</sup>.

As placas de PVX e COS são incubadas na estufa de CO<sub>2</sub> (24 horas a 48 horas) e as restantes placas são incubadas na estufa a 35°C (24 horas, excepto para a placa de Sabouraud que é incubada mais 24 horas na estufa a 30° C, sendo o registo do resultado efectuado apenas ao fim de 48 horas) <sup>(33)</sup>.

Neste tipo de amostras biológicas qualquer crescimento é valorizado, procedendo-se à identificação e TSA do(s) agente(s) isolado(s) <sup>(33)</sup>.

## **7.8. Exsudado purulento**

### **7.8.1. Exame Bacteriológico + Exame Micológico**

Como para todas as amostras biológicas para as quais é solicitado exame bacteriológico, realiza-se um Gram direto (de um esfregaço da amostra) <sup>(33)</sup>.

As amostras são semeadas em:

- PVX;
- COS;
- MacConkey;
- Manitol;
- Sabouraud;
- Tubo de Tioglicolato <sup>(33)</sup>.

Neste tipo de amostras biológicas é valorizada a presença de até 3 estirpes diferentes, procedendo-se à sua identificação e TSA <sup>(33)</sup>.

## **7.9. Raspados de pele e anexos cutâneos (unha, pelo/cabelo)**

### 7.9.1. Exame Micológico

Exame microscópico direto da amostra.

Exame cultural em Sabouraud à temperatura ambiente até formação de colónias suscetíveis de serem identificadas por:

- Características macroscópicas das colónias;
- Exame microscópico de uma suspensão aquosa das colónias após coloração com azul-de-metileno;
- Sistemas automatizados comerciais – RYI (Rapid Yeast Identification) – análise demora 4 horas e só pode ser usada para fungos leveduriformes.

O exame cultural pode durar até um mês até ser classificado como negativo.

## **7.10. Exsudado vaginal**

Deverá ser sempre feito um pequeno inquérito à utente:

- Nome completo;
- Idade;
- Data da última menstruação;
- Se estiver grávida o n.º de semanas de gravidez;
- Menopausa e utilização de terapia hormonal de substituição;
- Se está ou esteve recentemente a fazer antibioterapia;
- Se utiliza tampões ou dispositivos intra-uterinos;
- Se tem outros antecedentes <sup>(7)</sup>.

Nota importante: deve ser sempre referido o local da colheita, pois dele depende o tipo de microrganismos a pesquisar <sup>(7)</sup>.

Há 3 zonas de colheita que se dividem do seguinte modo:

- 1) Aparelho genital baixo formado pela vulva e vagina;
- 2) Canal do endocérvix ou endocolo- produz o muco cervical;
- 3) Aparelho genital alto formado pelo útero e trompas (só colhidas cirurgicamente) <sup>(7)</sup>.

#### 7.10.1. Exame Parasitológico

Observação a fresco ao microscópio ótico do esfregaço obtido da zaragatoa de colheita/transporte numa lâmina <sup>(37)</sup>.

Procede-se à pesquisa de *Trichomonas vaginalis* <sup>(37)</sup>.

Referir a presença de leveduras, leucócitos ou outros elementos relevantes <sup>(37)</sup>.

#### 7.10.2. Exame Bacteriológico + Exame micológico

Semear a amostra nos seguintes meios de cultura:

- PVX;
- CNA (gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro) - é um meio de isolamento seletivo que permite o desenvolvimento das bactérias Gram positivo frequentemente detetadas nas amostras clínicas.

A gelose contém uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes (como o estreptococos).

A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana.

A presença de ácido nalidíxico e de colimicina permite inibir a maioria das bactérias Gram negativo bem como os *Bacillus* <sup>(38)</sup>.

- MacConkey;
- Sabouraud <sup>(37)</sup>.

As lâminas que acompanham o meio de transporte são fixadas pela chama, coradas pela coloração de Gram e observadas ao microscópio ótico (quando não são efetuadas durante a colheita efetua-se um esfregaço diretamente da zaragatoa) <sup>(37)</sup>.

Todas as placas são incubadas a 35°C ±2°C, mas as placas de PVX e CNA são incubadas numa estufa com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. A leitura das placas é efetuada no dia seguinte e registada <sup>(37)</sup>.

As placas de PVX e CNA são reincubadas na estufa de CO<sub>2</sub> até às 48h e a placa de Sabouraud é observada às 24h e reincubada à temperatura ambiente mais 24h <sup>(37)</sup>.

Neste tipo de exsudado é valorizada a presença de colónias de *Mobiluncus*, *Gardnerella*, *Neisseria*, *Streptococcus* do grupo B e fungos leveduriformes do género *Candida* <sup>(37)</sup>.

Quando aplicável, procede-se à identificação da bactéria isolada e ao respetivo TSA <sup>(37)</sup>.

### 7.10.3. Pesquisa de *Streptococcus* do grupo B

A gelose chromID™ Strepto B é um meio cromogénico seletivo utilizado para a deteção de *Streptococcus agalactiae* em mulheres grávidas e em recém-nascidos a partir de amostras de origem clínica <sup>(39)</sup>.

O *Streptococcus agalactiae* é responsável por infeções graves no recém-nascido (como a meningite), sendo que a sua deteção é particularmente importante para a prevenção, tratamento e seguimento das infeções.

A gelose chromID™ Strepto B é constituída por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas, 3 substratos cromogénicos e antibióticos <sup>(39)</sup>.

Estes componentes permitem detetar o *Streptococcus agalactiae* através do aparecimento espontâneo de colónias rosa pálido a vermelho <sup>(39)</sup>.



**Figura 52 – Isolamento de *Streptococcus agalactiae* na gelose chromID™ Strepto B.**

A maioria das outras espécies bacterianas e leveduras não se desenvolvem neste meio ou não formam colónias características <sup>(39)</sup>.

## **7.11. Exsudado uretral**

### 7.11.1. Exame parasitológico

Observar a fresco uma lâmina do produto, pesquisando ainda a presença de leveduras, leucócitos ou outros elementos relevantes <sup>(39)</sup>.

### 7.11.2. Exame Bacteriológico + Exame Micológico

O processamento das amostras é igual ao do exsudado vaginal pelo que já foi aí descrito <sup>(39)</sup>.

### 7.11.3. Pesquisa de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*

A pesquisa destes patógenos é apenas efetuada mediante pedido específico, sendo tal referido no relatório de todos os exsudados vaginais / uretrais para os quais não foi efetuada.

É usado o dispositivo Mycoplasma IST 2®, que permite a cultura, a identificação, a contagem indicativa e a determinação de sensibilidade aos antibióticos de *Ureaplasma sp.* e de *Mycoplasma hominis* <sup>(40)</sup>.

Este teste associa um caldo de cultura seletivo a uma galeria que contém 22 testes <sup>(40)</sup>.

As galerias são incubadas a 35-37°C durante 48 horas, e fornecem um resultado qualitativo/semi-quantitativo quanto à presença de ambas as bactérias:

- Negativo;
- Positivo < 10<sup>4</sup>;
- Positivo ≥ 10<sup>4</sup> <sup>(40)</sup>.

As galerias realizam o TSA (método automatizado de concentração crítica), lido caso o resultado seja positivo ≥ 10<sup>4</sup> (título clinicamente valorizável) <sup>(40)</sup>.



## 7.12. Hemoculturas

### 7.12.1. Exame Bacteriológico + Exame Micológico

As amostras de sangue são colhidas em frascos especiais específicos para serem incubados no equipamento Bactec 9050 que deteta, por espectrofotometria de infravermelhos, o dióxido de carbono resultante do metabolismo microbiano <sup>(41)</sup>.

As amostras que positivam são sujeitas, então, a:

- Exame microscópico do esfregaço corado por Gram;
- Exame cultural por subculturas em meios apropriados (PVX, COS e Sabouraud);
- Subsequente identificação e TSA do(s) microrganismo(s) isolado(s) <sup>(41)</sup>.

Os microrganismos mais frequentemente isolados no decorrer do estágio foram *Staphylococcus* coagulase negativo, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e alguns fungos.

Os resultados negativos são reportados ao 2.º e 7.º dia (resultado final) <sup>(41)</sup>.



## 8. Conclusão

Este relatório permitiu descrever as atividades desenvolvidas durante a unidade curricular estágio e nomear as competências adquiridas ao longo do mesmo.

A experiência adquirida foi tecnicamente bastante rica, fruto das boas condições de trabalho e da oportunidade para contactar com técnicos experientes e com uma considerável diversidade de metodologias.

Como aspetos facilitadores deste estágio saliento os conhecimentos, a experiência e disponibilidade das várias colaboradoras do setor, que fizeram com que este fosse um período de “despertar” para novos conhecimentos e realidades.

Clinicamente é de referir que, ainda que se trate de um laboratório privado, virado essencialmente para os utentes em ambulatório, devido ao elevado fluxo de trabalho e ao contacto com alguns hospitais, a diversidade de produtos biológicos permitiu igualmente diversificar e enriquecer a experiência obtida, nomeadamente no que respeita aos microrganismos isolados e outros casos especiais, normalmente só encontrados em ambiente hospitalar.

Este estágio foi muito importante ao nível de conhecimentos e experiência profissional adquiridos. A partir do estágio, que é uma ferramenta de aperfeiçoamento das técnicas e procedimentos teóricos aprendidos durante o mestrado em análises clínicas, foi adquirido um conhecimento único e ficou comprovada a compatibilidade da formação académica oferecida com a prática executada em campo.

A realização deste estágio foi essencial para a minha formação, não só a nível profissional mas também pessoal, e permitiu reconhecer que o técnico superior é uma ferramenta indispensável para o bom funcionamento da organização.

Para finalizar, considero ter atingido os objetivos propostos para este estágio e para este relatório, já que desenvolvi as minhas competências profissionais e procedi à reflexão crítica de todo o percurso.



## 9. Bibliografia

1. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – urinas. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
2. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – fezes. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
3. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – expetorações. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
4. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – exsudado orofaríngeo. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
5. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – exsudados nasais, pús, outros. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
6. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – esperma. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
7. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – exsudados vaginais. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
8. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – exsudados uretrais. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
9. Guimarães MC. Colheita de produtos biológicos – hemoculturas. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 08-06-2009.
10. Guimarães MC. Protocolo geral - urinas. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 12-05-2010.
11. Siemens Healthcare. Bula do rolo reagente Clinitek Atlas Pro®.
12. Core Diagnostics. Bula do Beta Clear HCG.
13. Meio cromogénico CPS3 da bioMérieux®. Disponível em: [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG\\_CLN\\_PRD&doc=PTG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_200&pubparams.sform=4&lang=pt](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_200&pubparams.sform=4&lang=pt). Acedido em: [22-08-2012].
14. Slidex Staph Plus®. Disponível em: [http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinicaldiagnostics/dynPage?open=CNL\\_CLN\\_PRD&doc=CNL\\_PRD\\_CPL\\_G\\_PRD\\_CLN\\_66&pubparams.sform=1&lang=en](http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinicaldiagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_66&pubparams.sform=1&lang=en). Acedido em: [22-08-2012].

15. MicroScan WalkAway 96 da Siemens®. Disponível em: <http://healthcare.siemens.com/microbiology-testing/microscansystems/walkaway-plus-system>. Acedido em: [22-08-2012].
16. Guimarães MC. Protocolo geral - fezes. Instrução de trabalho microbiologia. Revisto a 12-05-2010.
17. Kit comercial IBERKIT®. Disponível em: <http://www.monlab.es/descargas/pruebas%20rapidas/PARASITOLOGIA/easy-copros.pdf>. Acedido em: [22-08-2012].
18. Agar Salmonella Shigella. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9082>. Acedido em: [22-08-2012].
19. Agar desoxicolato-lisina-xilose. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9086>. Acedido em: [22-08-2012].
20. Agar de Sorbitol MacConkey. Disponível em: <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA-254455.pdf>. Acedido em: [22-08-2012].
21. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, Volume 365, Issue 9464, 19-25 March 2005, Pages 1073-1086
22. Meio agar MacConkey. Disponível em: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2855-macconkey-agar-plates-protocols>. Acedido em: [22-08-2012].
23. Caldo Gram Negativo. Disponível em: <http://www.biosystems.com.br/arquivos/produtos/922.pdf>. Acedido em: [22-08-2012].
24. Meio seletivo *Yersinia*. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9087>. Acedido em: [22-08-2012].
25. Meio seletivo *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9061>. Acedido em: [28-08-2012].
26. Pesquisa de sangue oculto. Disponível em: <http://www.nal-vonminden.com/pt/testes-rapidos/informacao-sobre-produtos/cat/cancro-do-colon/item/nadalsupRsup-fob-teste-cassete.html>. Acedido em: [28-08-2012].
27. Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – produto expetorações. Revisto a 12-05-2010.
28. Gelose de chocolate PolyViteX. Disponível em: [http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/PPM\\_catalogue.pdf](http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/PPM_catalogue.pdf). Acedido em: [22-08-2012].
29. Gelose Columbia com 5% sangue de carneiro. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9063>. Acedido em: [22-08-2012].

- 30.** Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – pesquisa de BAAR e exame cultural em Lowenstein. Revisto a 04-04-2008.
- 31.** Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – exsudado nasal. Revisto a 12-05-2010.
- 32.** Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – espermograma. Revisto a 20-05-2009.
- 33.** Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – exsudados purulentos e espermoculturas. Revisto a 20-05-2009.
- 34.** Meio manitol. Disponível em: [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG\\_CLN\\_PRD&doc=PTG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_175&pubparams.sform=7&lang=pt](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_175&pubparams.sform=7&lang=pt). Acedido em: [30-08-2012].
- 35.** Meio Sabouraud. Disponível em: [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG\\_CLN\\_PRD&doc=PTG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_175&pubparams.sform=6&lang=pt](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_175&pubparams.sform=6&lang=pt). Acedido em: [30-08-2012].
- 36.** Tubo de Tioglicolato. Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8421>. Acedido em: [30-08-2012].
- 37.** Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – exsudados vaginais e uretrais. Revisto a 20-05-2009.
- 38.** Meio CNA. Disponível em: [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG\\_CLN\\_PRD&doc=PTG\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_175&pubparams.sform=5&lang=pt](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_175&pubparams.sform=5&lang=pt). Acedido em: [30-08-2012].
- 39.** Gelose chromID™ Strepto B. Disponível em: <http://www.biomerieux-usa.com/upload/ChromID-Strepto-B-Brochure-1.pdf>. Acedido em: [30-08-2012].
- 40.** Bula do dispositivo Mycoplasma IST 2 da bioMérieux®.
- 41.** Guimarães MC. Instrução de trabalho microbiologia – hemoculturas. Revisto a 20-05-2009.