

Instituto Politécnico de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa  
2022/2023

## **Estágio em Microbiologia Clínica: Diagnóstico Microbiológico em Patologia Clínica**

Autora: Inês da Cunha Marques

Orientadoras:

Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro, Escola Superior de Tecnologia da  
Saúde de Lisboa

Especialista Isabel Maria de Almeida Marques Alves Paes de Faria,  
Hospital de Egas Moniz

Mestre Zúzeca Vanina Salvador Magalhães, Hospital de Egas Moniz

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

*Lisboa, 17 de Julho 2023*

Instituto Politécnico de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

## **Estágio em Microbiologia Clínica: Diagnóstico Microbiológico em Patologia Clínica**

Autora: Inês da Cunha Marques

Orientadoras:

Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Especialista Isabel Maria de Almeida Marques Alves Paes de Faria, Hospital de Egas Moniz

Mestre Zúzeca Vanina Salvador Magalhães, Hospital de Egas Moniz

Presidente do júri: Doutora Carina Alexandra Fernandes Ladeira, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Arguente: Especialista Bela Cristina Correia Ferreira, Hospital de Santa Maria

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

*Lisboa, 17 de Julho 2023*

## **DECLARAÇÃO DE DIREITOS DE CÓPIA**

Declaro que concedo à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa uma licença não exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, o meu Relatório de Estágio de natureza profissional, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a arquivar e, sem alterar o conteúdo, converter o presente trabalho entregue para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, nomeadamente através da sua digitalização, para efeitos de preservação e acesso.

Concordo que o meu Relatório de Estágio de natureza profissional seja colocada no repositório científico do Instituto Politécnico de Lisboa com o seguinte estatuto:

- Disponibilização imediata do conjunto de trabalho para acesso mundial;
- Retenho dos direitos de autor relativos ao Relatório de Estágio de natureza profissional o direito de a usar em trabalhos futuros.

Lisboa, 17 de julho de 2023

Inês da Cunha Marques



## Resumo

Os exames laboratoriais tornaram-se essenciais para o diagnóstico e terapêutica das mais variadas doenças. Assim, é de grande relevância que os laboratórios de patologia clínica garantam a qualidade dos resultados obtidos ao longo das diferentes fases laboratoriais.

A automação está cada vez mais presente nos laboratórios, possibilitando uma diminuição do tempo de resposta e de erros, uma elevação do fluxo de amostra, logo, é possível adquirir resultados rápidos e mais fiáveis a um elevado número de utentes em simultâneo.

O estágio enquadra-se no âmbito do Mestrado de Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola de Tecnologias de Saúde de Lisboa, do Instituto Politécnico de Lisboa, com duração total de 600 horas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Hospital Egas Moniz, pertencente ao Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, sob orientação das Doutoras Edna Soraia Gregório Ribeiro, Isabel Maria de Almeida Marques Paes de Faria e Zúzecca Vanina Salvador Magalhães.

Este relatório tem como objetivo descrever todas as etapas do processo laboratorial, caracterização e descrição do funcionamento do local de estágio, dos equipamentos, metodologias e técnicas utilizadas, abordando testes e parâmetros analíticos definidos, bem como o seu interesse clínico.

Por fim, o diagnóstico microbiológico é uma ferramenta essencial na saúde, permitindo detetar, isolar, avaliar a suscetibilidade a fármacos para condução a uma terapêutica, reduzindo a mortalidade e contribuindo para o bem-estar geral da população através da aplicação de várias técnicas e equipamentos. Embora tenham várias limitações, são melhorados e substituídos à medida que novos avanços tecnológicos ocorrem.

**Palavras-chave:** Diagnóstico; Identificação; Microbiologia; Tecnologias; Teste de Suscetibilidade a Antibióticos ou Antifúngicos.

## Abstract

Laboratory tests have become essential for the diagnosis and treatment of a wide range of diseases. Thus, it's very important that clinical pathology laboratories guarantee the quality of the results obtained throughout the different laboratory phases.

Automation is increasingly at laboratories, enabling a decrease in response time and errors, an increase in the flow of samples, therefore, it's possible to acquire quick and more reliable results from a large number of users simultaneously.

This internship is part of the Master's Degree in Clinical-Laboratory Technologies at the Lisbon Health School Technologies, at the Polytechnic Institute of Lisbon, with a total duration of 600 hours in the Microbiology and Molecular Biology Laboratory of Egas Moniz Hospital, belonging to the West Lisbon Hospital Center, under the guidance of Doctors Edna Soraia Gregório Ribeiro, Isabel Maria de Almeida Marques Paes de Faria and Dr. Zúzecca Vanina Salvador Magalhães.

This report aims to describe all stages of the laboratory process, characterization, and description of the operation of the internship location, equipment, methodologies and techniques used, addressing defined tests and analytical parameters, as well as their clinical interest.

Finally, microbiological diagnostic is an essential tool in health, allowing to detect, isolate, assess the susceptibility to drugs in order to conduct a therapy, reducing the mortality and contributing to the general well-being of the population through the application of several techniques and equipment. Although they've several limitations, they're improved and replaced as new technological advances occur.

**Key words:** Diagnosis; Identification; Microbiology; Technologies; Antibiotic or Antifungal Susceptibility Test.

# Índice Geral

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice Geral .....	vii
Índice de Tabelas .....	ix
Índice de Figuras .....	xi
Lista de siglas e acrónimos.....	xv
1 Introdução .....	1
1.1 Justificação do tema.....	1
1.2 Questão de partida.....	1
1.3 Objetivos .....	1
1.3.1 Objetivo geral.....	1
1.3.2 Objetivos específicos .....	1
2 Contextualização Teórica.....	2
2.1 Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental .....	2
2.1.1 Laboratório de microbiologia clínica e biologia molecular do Hospital Egas Moniz .....	3
2.1.1.1 Fases de diagnóstico laboratorial em microbiologia .....	4
2.1.1.2 Segurança do laboratório de microbiologia .....	5
2.1.1.3 Controlo de qualidade .....	7
2.1.1.4 Tecnologias aplicadas no diagnóstico .....	7
2.1.1.4.1 Observação da amostra através de microscopia.....	7
2.1.1.4.2 Exame Cultural <i>In Vitro</i> .....	14
2.1.1.4.3 Deteção de microrganismos.....	16
2.1.1.4.4 Identificação de microrganismos.....	19
2.1.1.4.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	22
2.1.1.4.6 Deteção de antigénios .....	24
2.1.1.4.6.1 Pesquisa de antigénios por imunocromatografia .....	24
2.1.1.4.6.2 Pesquisa de antigénios por imunofluorescência .....	25

2.1.1.4.7	Testes à amplificação de ácidos nucleicos (TAAN).....	26
2.2	Microbiota humano.....	32
2.2.1	Produtos Biológicos .....	34
2.2.1.1	Urina .....	35
2.2.1.2	Exsudados .....	35
2.2.1.3	Fezes .....	35
2.2.1.4	Sangue e sangue medular .....	35
2.2.1.5	Amostras respiratórias .....	36
2.2.1.6	Líquidos estéreis .....	36
2.3	Bacteriologia .....	36
2.3.1	O Papel das Bactérias nas Doenças .....	37
2.3.2	Diagnóstico Laboratorial de Doenças Bacterianas .....	37
2.3.2.1	Valorização .....	38
2.3.3	Micobacteriologia .....	39
2.4	Micologia.....	40
2.4.1	O Papel dos Fungos nas Doenças .....	41
2.4.2	Diagnóstico Laboratorial de Doenças Fúngicas.....	41
2.5	Parasitologia .....	42
2.5.1	O Papel dos Parasitas nas Doenças .....	43
2.5.2	Diagnóstico Laboratorial de Doenças Parasitárias .....	44
2.6	Virologia .....	44
2.6.1	O Papel dos Vírus nas Doenças .....	45
2.6.2	Diagnóstico Laboratorial de Doenças Virais .....	46
3	Considerações finais .....	47
4	Referências bibliográficas .....	49
5	Anexos .....	57
6	Apêndices .....	87

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Tabela resumo dos testes bioquímicos utilizados no LMBM (Fonte: Tille, 2014; Sperber et al., 1975).....	21
Tabela 2.2 - Tipos de TSA utilizados no LMCBM (fonte: Tille PM, 2017; Ligozzi et al., 2012; Garrote et al., 2000; Biomérieux; GeneXpert; Etest; Bruker Daltonics).....	23
Tabela 2.3 - Valorização das amostras de urina (Fonte: Direção-Geral de Saúde, 2012; Hooton T, Bradley S, Cardenas D et al., 2010). .....	39



## Índice de Figuras

Figura 2.1 - Especialidades presentes no HEM (Fonte: CHLO).....	2
Figura 2.2 - Organograma do Serviço de Patologia Clínica (Fonte: CHLO).....	3
Figura 2.3 - Fluxograma do diagnóstico laboratorial. ....	4
Figura 2.4 - Fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (Fonte: ISO 2005).....	5
Figura 2.5 - Medidas de segurança para a segurança de um laboratório microbiológico (Fonte: ISO 2005).....	6
Figura 2.6 - Câmara de fluxo laminar tipo A/B3 Classe II (Fonte: NUAIRE).....	6
Figura 2.7 - Comparação entre as paredes celulares das bactérias Gram+ e Gram-: A - Bactéria Gram+ com espessa camada de peptidoglicanos que contém ácidos teicóicos e lipoteicoicos; B – Bactéria Gram- com fina camada de peptidoglicanos e uma membrana externa que contém lipossacarídeos, fosfolípidos e proteínas. O espaço periplasmático entre o citoplasma e as membranas externas contém as proteínas de transporte (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016). ....	9
Figura 2.8 - Técnica de coloração de Gram.....	9
Figura 2.9 - Aerospray ® Gram (Fonte: ELITechGroup). ....	9
Figura 2.10 - Técnica de coloração de Ziehl-Neelsen.....	10
Figura 2.11 - Equipamento de coloração de Ziehl-Neelsen (Fonte: Biomérieux). ....	10
Figura 2.12 - Ilustração do tipo de consistência de fezes relacionada com os tipos de formas parasitárias (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).....	10
Figura 2.13 - Técnica de Willis. ....	11
Figura 2.14 - Técnica de Ritchie.....	11
Figura 2.15 - Técnica Kato-Katz. ....	12
Figura 2.16 - Observação macroscópica e microscópica: A - Indícios da presença de larvas; B - <i>Strongyloides</i> . ....	12
Figura 2.17 - Técnica de pesquisa de larvas em cultura.....	12
Figura 2.18 - Técnica de gota espessa.....	12
Figura 2.19 - Técnica de esfregaço de sangue periférico. ....	13
Figura 2.20 - Coloração de Ziehl-Neelsen modificada. ....	13
Figura 2.21 - Técnica da fita cola. ....	13
Figura 2.22 - Técnicas de inoculação: por esgotamento semi-quantitativo (A), por quadrantes (B) e por inundação (C) (Fonte: Microbe Notes). ....	15
Figura 2.23 - Condições para um ambiente anaeróbico (Fonte: Thermo Fisher Scientific). ....	15
Figura 2.24 - Equipamento BACT/ALERT Virtuo (Fonte: Biomérieux). ....	17
Figura 2.25 - Garrafas de hemocultura BACT/ALERT (Fonte: Biomérieux). ....	17

Figura 2.26 - Resultados visuais obtidas pelas garrafas BACT/ALERT para deteção de microrganismos: A - Positivo; B – Negativo (Fonte: Biomérieux).	17
Figura 2.27 - Equipamento BACTEC 9050 (Fonte: Becton Dickinson).	18
Figura 2.28 - Garrafas de hemocultura BD BACTEC™ Myco/F Lytic Medium (Fonte: Becton Dickinson).	18
Figura 2.29 - Equipamento BACTEC MGIT 960 (Fonte: Becton Dickinson).	18
Figura 2.30 - Gráfico representativo da fluorescência ao longo do tempo de incubação de micobactérias no equipamento: Há multiplicação de micobactérias através do consumo de oxigénio. Quando o oxigénio deixa de estar presente, o crescimento microbiológico termina (Fonte: Geogebra).	19
Figura 2.31 - Equipamento Vitek MS Prime (Fonte: Biomérieux).	21
Figura 2.32 - Materiais necessários para identificação de microrganismos no Vitek MS Prime: A – Kit PickMe™; B - Slide (Fonte: Biomérieux).	21
Figura 2.33 - Procedimento para identificação de microrganismo através do Vitek® PickMe™ (Fonte: Biomérieux).	21
Figura 2.34 - Dispositivo de medição de densidade DensiCHECK (Fonte: Biomerieux:).	22
Figura 2.35 - Equipamento Vitek 2 (Fonte: Biomérieux).	22
Figura 2.36 - Carta para identificação de microrganismos, TSA no Vitek 2 (Fonte: Biomerieux).	22
Figura 2.37 - Ilustração dos componentes do TIC de fluxo lateral (Fonte: Labtest).	25
Figura 2.38 - Interpretação de resultados de TIC (Fonte: Abbott).	25
Figura 2.39 - MONOFLUO™ Legionella pneumophila IFA Test Kit – 32514 (Fonte: BIO-RAD).	26
Figura 2.40 - Etapas de PCR (fonte: Biomérieux).	26
Figura 2.41 - Ilustração da comparação entre RT-PCR e PCR (Fonte: OMEGA).	27
Figura 2.42 - GeneXpert® XVI (Fonte: Cepheid).	28
Figura 2.43 - Cartucho do GeneXpert (Fonte: Cepheid).	28
Figura 2.44 -BioRobot EZ1 (Fonte: QIAGEN).	29
Figura 2.45 - Ilustração do processo de purificação de DNA (Fonte: QIAGEN).	29
Figura 2.46 - Seegene STARLET (Fonte: Hamilton).	29
Figura 2.47 - CFX96 Real Time System (Fonte: Bio-Rad).	30
Figura 2.48 - PANTHER FUSION® (Fonte: Hologic).	30
Figura 2.49 - FilmArray™ (Fonte: Biomérieux)	31
Figura 2.50 - Procedimento aplicado no equipamento FilmArray™ (Fonte: Biomérieux).	31
Figura 2.51 - MOBIDING (Sistema Novodiag®) MicroArray (Fonte: Hologic).	32
Figura 2.52 - Procedimento aplicado no equipamento MicroArray (Fonte: Hologic).	32

Figura 2.53 - Microbiota humano (Fonte: Schwebker, 1999; Prakash et al. 2011; Bassis et al 2015; Libório et al. 2005; Jenkinson et al. 2005).....	33
Figura 2.54 - Microrganismos considerados patogénicos (Fonte: Tille, 2017). .....	34
Figura 2.55 - Principais características dos procariontes e eucariontes (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).....	36
Figura 2.56 - Formas morfológicas das bactérias (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016). .....	36
Figura 2.57 - Classificação das bactérias patogénicas (Fonte: adaptado de Barroso et al., 2014).....	38
Figura 2.58 - Principais características dos fungos (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016). .....	40
Figura 2.59 - Classificação dos fungos patogénicos (Fonte: Tille, 2017). .....	40
Figura 2.60 - Grupos de parasitas mais comuns no laboratório (Fonte: W. Peter, H.M. Gilles, 1981).....	43
Figura 2.61 - Principais características dos vírus (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).	45



## Lista de siglas e acrónimos

CHLO	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais ( <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> )
CMI	Concentração Mínima Inibitória
Columbia HK + 5%	Columbia Hemina vit K + 5% sangue
CRINI	Consulta de Risco de Infecção na Imunomodulação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfato Desoxirribonucleotídeos
Dra	Doutora
EUCAST	Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana ( <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> )
Gram-	Gram-negativa
Gram+	Gram-positiva
GS	Gelose de Sangue
HEM	Hospital de Egas de Moniz
HEPA	Detenção Altamente Eficaz de Partículas ( <i>High Efficiency Particulate Arrestance</i> )
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSC	Hospital de Santa Cruz
HSFX	Hospital São Francisco Xavier
IFA	Teste de Imunofluorescência Indireta ( <i>Indirect Immunofluorescent Assay</i> )
L	Litro
LBA	Lavado Broncoalveolar
LCR	Líquido Céfalo-Raquidiano
LMCBM	Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular
MAC	Macconkey
MALDI-TOF MS	Espetrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> )
MGIT	Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias ( <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i> )
mL	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina ( <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> )

NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PAC	Pneumonias Adquiridas na Comunidade
PBP2a	Proteína de Ligação à Penicilina 2 <sup>a</sup>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PML	Passagens do Meio Líquido
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> )
SEIMC	Sociedade Espanhola de Doenças Infeciosas e Microbiologia Clínica
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TAAN	Testes Associados à Amplificação de Ácidos Nucleicos
TIC	Teste Imunocromatográfico
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSDT	Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UK NEQAS	<i>United Kingdom National External Quality Assesment Scheme</i>
UV	Ultravioleta
µL	Microlitro

# 1 Introdução

## 1.1 Justificação do tema

O Homem é colonizado por uma vasta diversidade de microrganismos, que constituem uma comunidade essencial para a saúde de cada indivíduo designada por microbiota humano.

As infeções podem ser causadas por microrganismos exógenos e/ou endógenos, se as defesas imunitárias estiverem comprometidas, impossibilitando o combate a microrganismos patogénicos.

O conjunto de procedimentos e técnicas, denominado por diagnóstico microbiológico, tem grande relevância para o prognóstico, prevenção e monitorização terapêutica de variadas patologias.

O presente relatório de estágio pretende descrever as etapas do processo laboratorial em microbiologia clínica.

## 1.2 Questão de partida

Qual a importância do diagnóstico microbiológico para o tratamento adequado de doenças infecciosas?

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo geral

Compreender a teoria aplicada à prática do diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica.

### 1.3.2 Objetivos específicos

Compreender as etapas da marcha laboratorial e as diferentes metodologias aplicadas na deteção, isolamento e identificação de microrganismos presentes em amostras biológicas com relevância médica e a importância da sua resistência a antimicrobianos para a aplicação de terapêuticas adequadas e diferenciadas.

## 2 Contextualização Teórica

### 2.1 Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental

O Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO) foi fundado a 29 de dezembro de 2005, integrando o Hospital de Egas de Moniz (HEM), Hospital de Santa Cruz (HSC) e o Hospital São Francisco Xavier (HSFX), visando a prestação de cuidados de saúde de qualidade em tempo útil a todos os cidadãos nas três unidades hospitalares, mas também atuando em atividades complementares como formação e investigação (1).

No HEM podem ser encontradas diversas especialidades como as observadas abaixo, de onde provém a maioria das amostras a estudar.

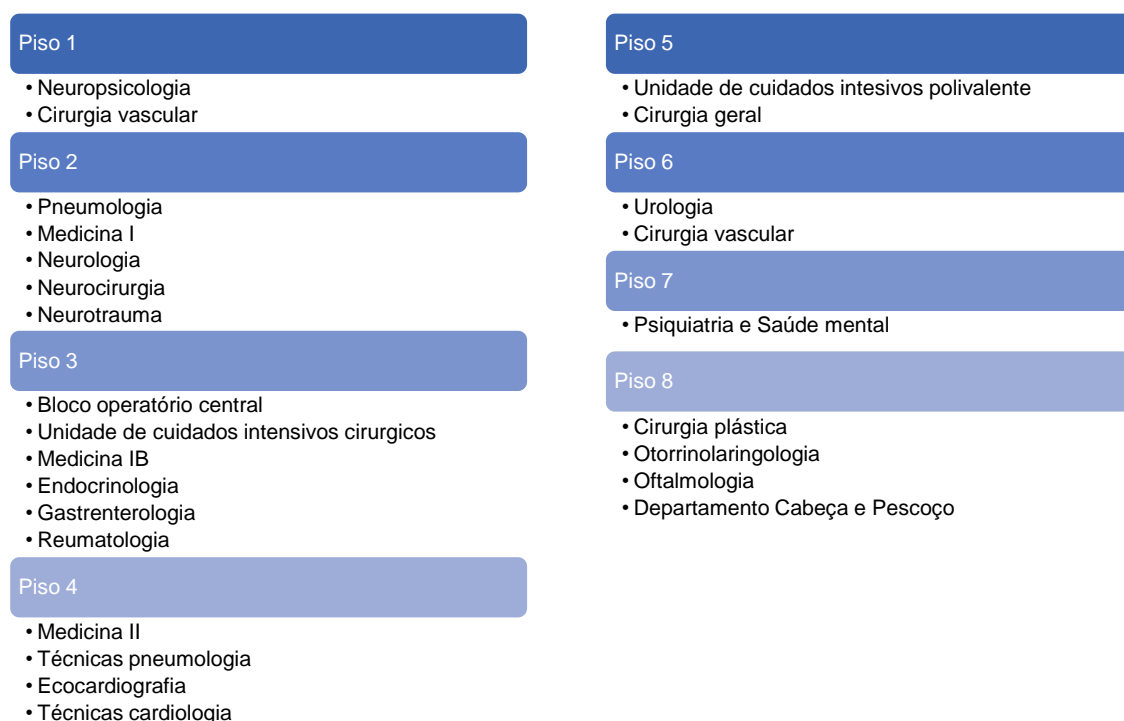


Figura 2.1 - Especialidades presentes no HEM (Fonte: CHLO).

O Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular (LMCBM) integra o Serviço de Patologia Clínica (SPC) do CHLO, sendo atualmente dirigido pela Professora Doutora Ana Paula Azevedo, sendo a coordenação do LMCBM da responsabilidade da Dra. Cristina Toscano (1).

O SPC organiza-se de acordo com o organograma representado na Figura 2.2 (1).

SERVIÇO PATOLOGIA CLÍNICA

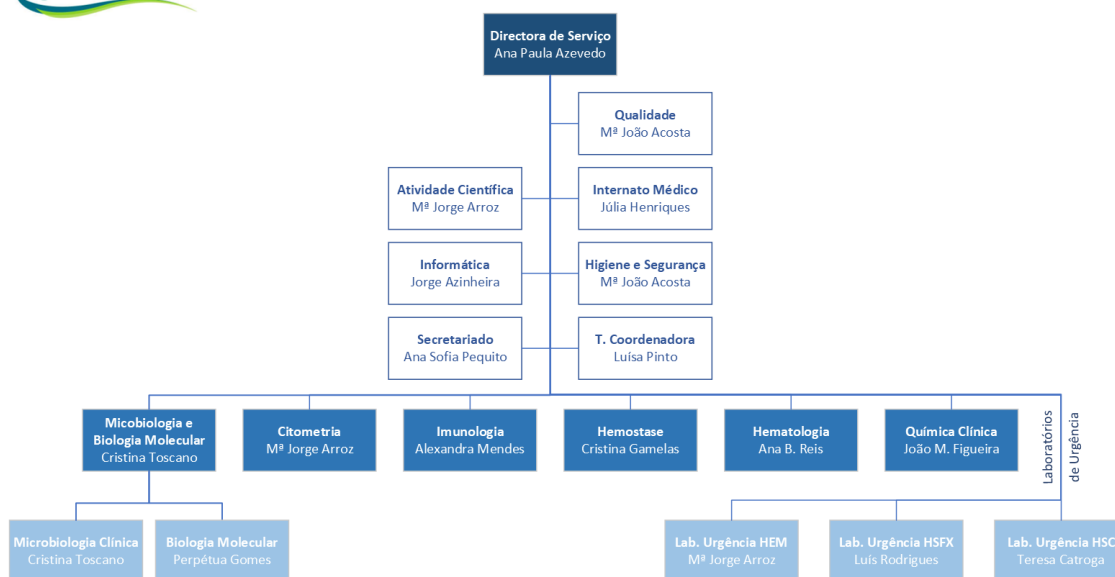


Figura 2.2 - Organograma do Serviço de Patologia Clínica (Fonte: CHLO).

A equipa do SPC é composta por Médicos Patologistas Clínicos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) da Área das Análises Clínicas e Saúde Pública, Assistentes Técnicos e Assistentes Operacionais (1).

Existem três polos que constituem o SPC:

- Laboratório Central situado no HSFX, onde estão os laboratórios de Química Clínica, Hematologia, Hemostase, Imunologia, Citometria de Fluxo e o Laboratório de Urgência do HSFX;
- Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular situado no HEM;
- Laboratório de Urgência do HEM e do HSC (1).

### 2.1.1 Laboratório de microbiologia clínica e biologia molecular do Hospital Egas Moniz

Antigamente denominado por Hospital do Ultramar, no HEM encontram-se as instalações do LMCBM como já mencionado. Este possui uma área de receção/atendimento e de triagem das amostras recebidas, através de uma cadeia de transportes, previamente identificadas e com pedido documentado em sistema informático. No que diz respeito apenas ao espaço da Microbiologia, encontra-se dividido nas áreas de bacteriologia, micobacteriologia, micologia, parasitologia e virologia (1).

O LMCCBM elabora as normas de colheita, conservação e transporte de amostras, estabelece rotinas microbiológicas para isolamento e identificação de agentes microbianos relevantes, determina a suscetibilidade aos antimicrobianos, efetua o controlo de qualidade das atividades e processos de esterilização, divulga e pratica as normas de biossegurança, participa no rastreamento epidemiológico de surtos de infeções hospitalares juntamente com a Comissão de Controlo de Infeção Hospitalar e outras entidades de saúde como o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, informa periodicamente sobre dados relacionados com a etiologia da infeções hospitalares e resistência aos antimicrobianos (2).

Abaixo encontra-se um fluxograma geral do diagnóstico laboratorial.

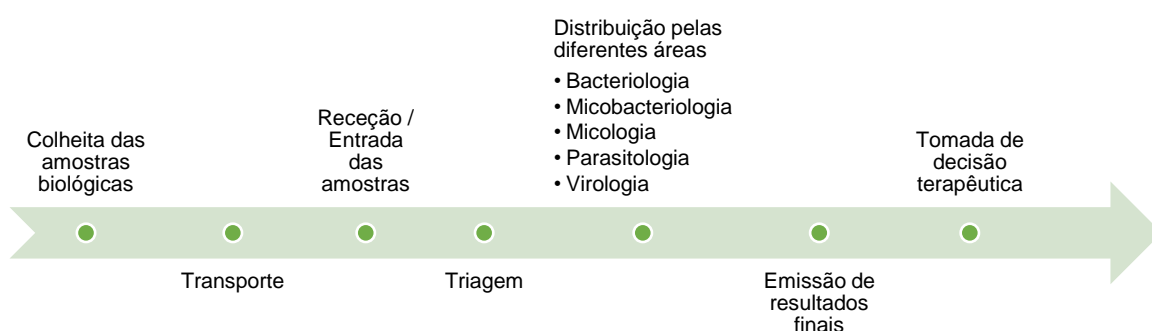


Figura 2.3 - Fluxograma do diagnóstico laboratorial.

### 2.1.1.1 Fases de diagnóstico laboratorial em microbiologia

O diagnóstico laboratorial organiza-se em diferentes fases:

- A **Fase Pré-analítica** compreende:
  - prescrição do exame microbiológico;
  - preparação do doente para a colheita da amostra (se aplicável);
  - colheita segundo o Manual de Colheitas do LMCCBM;
  - identificação correta da amostra;
  - transporte em condições adequadas;
  - triagem no LMCCBM.
- A **Fase Analítica** compreende:
  - processamento das amostras;
  - resultados.
- A **Fase Pós-analítica** compreende:
  - validação de resultados;
  - interpretação (3).



Figura 2.4 - Fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (Fonte: ISO 2005).

É na **fase pré-analítica** do diagnóstico laboratorial que se verificam a maioria dos erros. Para que sejam minimizados, deverão ser seguidas as normas do “Manual de Colheitas” e as *guidelines* para uma orientação exata da colheita e transporte de amostras, que estão representados no Anexo 1 (3)(4).

À chegada das amostras ao LMCBM, são integrados no sistema informático Clinidata os pedidos para essas amostras, o trabalho é realizado pelo secretariado e encaminhado até à área laboratorial onde são triadas pelos TSDT. Estando a amostra em conformidade com o “Manual de Colheitas”, são impressas as etiquetas com códigos de barras e escolhidos os meios de cultura ou técnicas adequadas.

A **fase analítica** inicia-se com a manipulação da amostra, podendo ser utilizados equipamentos, meios de cultura e testes rápidos para obtenção de resultados (3).

A **fase pós-analítica** é a última deste processo, onde os resultados são verificados e avaliados pelos TSDT’s e pelos médicos patologistas, sendo emitido o resultado final dos exames incluindo a interpretação do responsável (3).

### 2.1.1.2 Segurança do laboratório de microbiologia

O controlo de infeções tem de ter em conta os princípios de esterilização, desinfeção e antissepsia (5).

#### Esterilização

A esterilização é a destruição total de formas microbianas, através de procedimentos físicos (como vapor sob pressão, filtração, radiação ultravioleta e radiação ionizante) ou agentes químicos (como ácido peracético e glutaraldeído).

## Desinfecção

A desinfecção é a destruição da maioria das formas microbianas, contudo esporos bacterianos e organismos resistentes podem continuar viáveis. Esta pode ser dividida em três categorias:

- desinfecção de alto nível, elimina todos os microrganismos patogénicos exceto um grande número de esporos bacterianos;
- desinfecção de nível intermédio, elimina todos os microrganismos patogénicos exceto esporos bacterianos;
- desinfecção de baixo nível, elimina a maioria das bactérias vegetativas e alguns vírus.

A eficácia depende do material a ser desinfetado, resistência dos organismos, concentração do desinfetante e duração e temperatura de exposição. Para este objetivo são utilizadas altas temperaturas (como calor húmido) ou métodos líquidos (como compostos de cloro).

## Antissepsia

Os agentes antissépticos permitem a redução do número de microrganismos na superfície da pele. Para este objetivo são utilizados agentes antissépticos (como álcool).

Figura 2.5 - Medidas de segurança para a segurança de um laboratório microbiológico (Fonte: ISO 2005).

Para além destes componentes existem técnicas que têm de ser praticadas de acordo com os níveis de biossegurança que representam. As instalações laboratoriais designam-se por:

- Laboratório de base, corresponde ao nível 1 de segurança biológica e ao nível 2 de segurança biológica;
- Laboratório de confinamento, corresponde ao nível 3 de segurança biológica;
- Laboratório de confinamento máximo, corresponde ao nível 4 de segurança biológica (6).

O LMCBM é um laboratório de nível 2 de biossegurança, onde são praticadas técnicas de microbiologia em segurança, com fatos de proteção em bancadas de trabalho e câmaras de segurança biológica de classe II para potenciais aerossóis, câmaras estas que protegem o operador, o produto e evitam a contaminação cruzada, incluindo a presença de um filtro de retenção altamente eficaz de partículas (*High Efficiency Particulate Arrestance* – HEPA) que são capazes de filtrar partículas que são direcionados através de ventilação para o sistema de exaustão do edifício (7,8).



Figura 2.6 - Câmara de fluxo laminar tipo A/B3 Classe II (Fonte: NUAIRE).

O fluxo laminar permite que o ar se mova suavemente em torno dos objetos na área de trabalho, minimizando a turbulência e a contaminação cruzada (7,8).

Por outro lado, a câmara de biossegurança utilizada em parasitologia é de nível 1, retendo os potenciais aerossóis provenientes das amostras biológicas (6).

### 2.1.1.3 Controlo de qualidade

O LMCBM segue um plano de melhoria contínua dos processos envolvidos na sua rotina. Para isto, é aplicado o controlo de qualidade tanto a nível interno como a nível externo, a fim de identificar e evitar consequências provenientes desses erros.

O **controlo de qualidade interno** compreende um conjunto de procedimentos e práticas que o laboratório adota de forma a garantir um correto funcionamento de meios de cultura, equipamentos e dos diversos testes (9).

O **controlo de qualidade externo** é feito periodicamente. Envolve um conjunto de avaliações de desempenho de sistemas analíticos, através de análises e padrões certificados, e comparações inter-laboratoriais. O LMCBM do CHLO participa no programa da *United Kingdom National External Quality Assessment Scheme* (UK NEQAS) que constitui uma organização britânica responsável pela distribuição de programas de avaliação externa de qualidade aos laboratórios que nela participam. Esta organização envia amostras com uma história clínica para o laboratório, que são processadas, enviadas e avaliadas com um *score* (10).

### 2.1.1.4 Tecnologias aplicadas no diagnóstico

Durante o processo laboratorial, existem diversas tecnologias que permitem obter resultados e reduzir a resposta em tempo útil, sempre com finalidade de garantir resultados fidedignos, cujos procedimentos de controlo de qualidade acima referidos têm extrema importância (11).

Na microbiologia nem tudo é automatizado, mas a tecnologia existente permite minimizar os erros inerentes ao fator humano, assim como acelerar a obtenção de resultados, o que se traduz numa melhoria da prestação de cuidados, porque permite a intervenção do clínico de forma direcionada e mais precocemente (11).

#### 2.1.1.4.1 Observação da amostra através de microscopia

A microscopia ótica pode ser utilizada como auxílio ou como fator essencial no diagnóstico laboratorial, sendo possível afirmar a valorização da amostra e a identificação presuntiva de agentes etiológicos, detetando células bacterianas, elementos fúngicos e parasitários (5,12,13).

No LMCBM existem microscópios que apresentam diferentes fundamentos:

- Microscopia de campo claro – Uma fonte de luz é utilizada para iluminar a amostra, um condensador para focar a luz no campo que se pretende observar e um sistema de lentes, as objetivas e as oculares para ampliar a imagem da amostra. Com este tipo de método, a amostra é observada por transiluminação, onde a luz passa do condensador para a amostra;
- Microscopia de fluorescência – Utiliza fluorocromos que absorvem luz ultravioleta ou ultrazul de comprimento de onda curto, emitindo energia num comprimento de onda visível superior. Uma série de filtros são usados para bloquear o calor vindo da lâmpada, eliminando a luz infravermelha e selecionando o comprimento de onda apropriado para excitar o fluorocromo. Assim, os organismos corados com fluorocromos marcados por anticorpos são iluminados em contraste com um plano de fundo negro (5).

Neste laboratório é utilizada maioritariamente a microscopia ótica, sobretudo na bacteriologia, parasitologia e micologia.

#### 🔍 **Bacteriologia:**

O exame microscópico de amostras para o exame bacteriológico é de grande importância para deteção e identificação/distinção de microrganismos (5).

##### **- Exame a fresco**

O exame a fresco dá-se pela observação de microrganismos diretamente dos materiais biológicos, tanto em termos de forma como de movimentação dos mesmos.

No caso da bacteriologia, observam-se as formas de bacilos, cocos ou outras, com ou sem movimento, principalmente para diferenciação entre bactérias e leveduras, que em cultura podem ter um aspeto muito semelhante (14,15).

##### **- Screening**

Consiste na observação das lâminas coradas com as técnicas de Gram e Ziehl-Neelsen, onde se têm em consideração as células epiteliais e células polimorfonucleares como os neutrófilos (Coloração de Gram) e as bactérias ácido-resistentes (Coloração de Ziehl-Neelsen) (14).

##### **- Coloração de Gram**

A **coloração de Gram** é uma coloração diferencial, que permite distinguir bactérias Gram-positiva (Gram+) e Gram-negativa (Gram-), com base na afinidade com os corantes, determinada pela composição da parede celular (5).

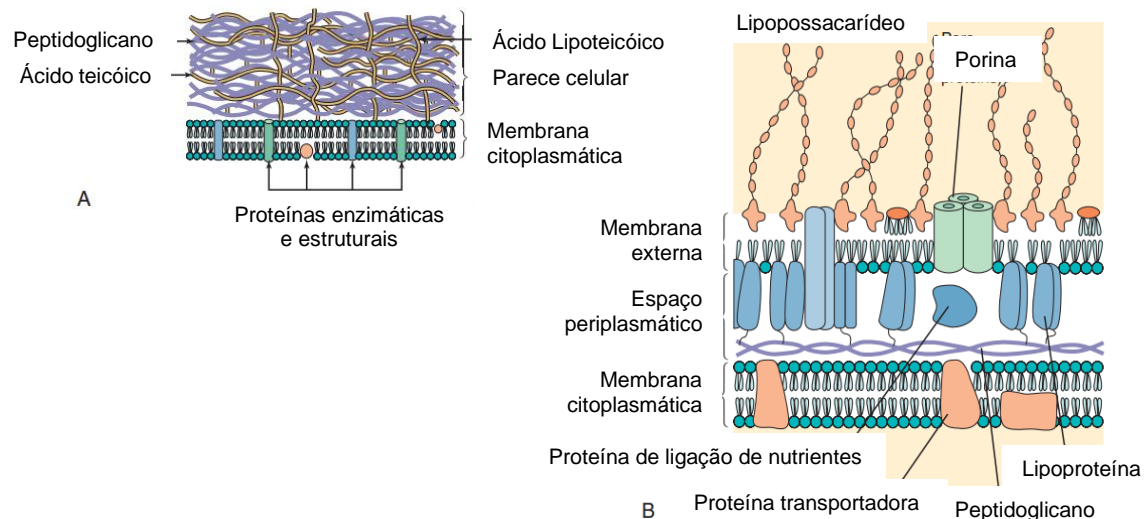


Figura 2.7 - Comparação entre as paredes celulares das bactérias Gram+ e Gram-: A - Bactéria Gram+ com espessa camada de peptidoglicanos que contém ácidos teicóicos e lipoteicóicos; B – Bactéria Gram- com fina camada de peptidoglicanos e uma membrana externa que contém lipossacarídeos, fosfolípidos e proteínas. O espaço periplasmático entre o citoplasma e as membranas externas contém as proteínas de transporte (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).

Nesta técnica, é inicialmente aplicado o corante cristal violeta (cor roxa) que penetra a parede celular, seguindo de uma solução de lugol (iodo) que aumenta a ligação do corante à parede bacteriana. Posteriormente, é realizada uma lavagem através de uma solução descolorante à base de álcool e acetona, que remove o corante não ligado. No final é adicionado um segundo corante de cor diferente, como a safranina (cor rosa), que cora os microrganismos que não retiveram o primeiro corante, criando assim, um contraste (5)(13)(16).

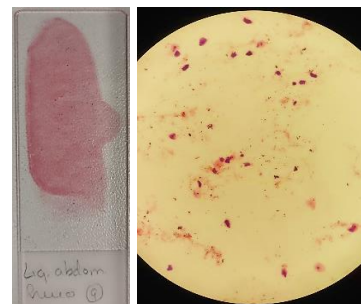


Figura 2.8 - Técnica de coloração de Gram.

Assim, as bactérias Gram+ retêm o cristal violeta, corando de violeta/roxo por possuírem uma dupla camada de peptidoglicanos. Já as bactérias Gram- retêm apenas o segundo corante por possuírem uma fina camada de peptidoglicanos e uma membrana externa, pelo que não retém o primeiro corante (5,13,16,17). Esta técnica pode ser realizada manualmente, contudo, atualmente já é executada através do equipamento Aerospray® Gram (ELITechGroup) no LMCBM (18).



Figura 2.9 - Aerospray® Gram (Fonte: ELITechGroup).

### - Coloração de Ziehl-Neelsen

A **coloração de Ziehl-Neelsen** é uma coloração diferencial para detectar bacilos álcool-ácido resistentes, nomeadamente, bactérias do género *Mycobacterium*, como o *M. tuberculosis* (13).

A parede celular destas bactérias contém ácidos micólicos, que as tornam resistentes à descoloração por soluções álcool-ácidas. Assim, após aplicação do primeiro corante, carbolfucsina (cor vermelho), os bacilos álcool-ácido resistentes retém-no e mantém a cor vermelha. Em seguida, é adicionado um corante, azul de metileno (cor azul), que cora as células e outros microrganismos que perderam a coloração quando aplicado o primeiro corante (13).

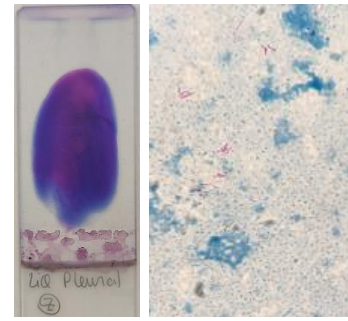


Figura 2.10 - Técnica de coloração de Ziehl-Neelsen.

No final do processo, os bacilos álcool-ácido resistentes obtém coloração vermelha, enquanto os restantes elementos são observados a azul (13).

Esta técnica pode ser realizada manualmente, contudo, atualmente, já é executada pelo equipamento Ralstainer (Biomérieux®) no LMCBM que utiliza a técnica da coloração de Ziehl-Neelsen para a observação específica de micobactérias (19).



Figura 2.11 - Equipamento de coloração de Ziehl-Neelsen (Fonte: Biomérieux).

### 🗨️ Parasitologia:

O exame microscópico de fezes é de grande importância em caso de suspeita de parasitose intestinal, incluindo o exame a fresco e técnicas de concentração de parasitas, de modo a aumentar a sensibilidade do diagnóstico (17).

#### - Exame a fresco

A análise de fezes inicia-se com uma avaliação macroscópica, caracterizando-as de acordo com o grau de digestão, cor, consistência (fezes diarreicas, pastosas, sangrentadas, moldadas ou duras) e pela presença de vermes, de modo a determinar o tipo de técnica a utilizar no diagnóstico microbiológico visto que a consistência das amostras fecais está relacionada com o tipo de parasita presente:

- Líquidas – formas vegetativas ou trofozoitos;
- Sangrentadas e mucosas em fezes líquidas e pastosas – infecção amebiana;
- Pastosas – trofozoitos e quistos;
- Formadas – quistos;

Oocistos de coccídea, esporos de microsporidia e ovos de helmintas podem ser encontradas em qualquer tipo de amostras (14,20).

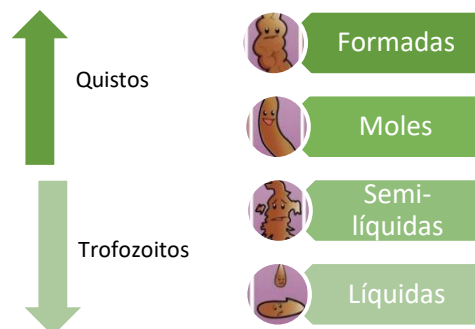


Figura 2.12 - Ilustração do tipo de consistência de fezes relacionada com os tipos de formas parasitárias (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).

Em microscopia podem ser observadas as formas imaturas dos protozoários (ovos de helmintas, larvas e trofozoitos), com ou sem movimento com adição de cloreto de sódio (NaCl). Dependendo do material biológico podem ser observadas células humanas, fibras, ovos de helmintos, larvas, entre outros (14).

#### - Técnica de Willis ou método de concentração por flutuação

A técnica de Willis é realizada em todos os doentes aos quais é solicitado o exame parasitário, tendo como objetivo observar ovos leves de parasitas, quistos de protozoários e oocistos de coccídeos através de flutuação numa solução saturada (solução Willis) (20,21).

A solução concentrada de Willis é uma solução hipertônica que contém sulfato de zinco e cloreto de sódio, permitindo a concentração de elementos parasitários à superfície de tubos cilíndricos com a amostra, que serão aderidas às lamelas colocadas no topo desses mesmos tubos. As lamelas são colocadas em lâminas e são observadas ao microscópio (21).

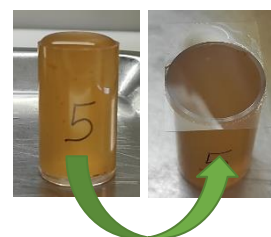


Figura 2.13 - Técnica de Willis.

#### - Técnica de Ritchie ou método de concentração por sedimentação

A técnica de Ritchie tem como objetivo recuperar ovos, larvas de helmintas e quistos de protozoários em amostras de fezes tratadas com NaCl. A aplicação de formol e de éter etílico permitem fixar a amostra e concentrar as formas parasitárias. Através de uma centrifugação, é possível obter um sedimento com todas as formas parasitárias presentes na amostra para posterior observação (20,22).

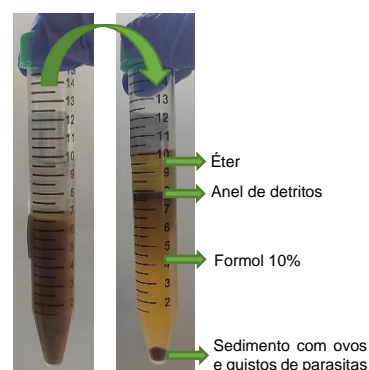


Figura 2.14 - Técnica de Ritchie.

#### - Microscopia de fluorescência

No LMCBM, após a Técnica de Ritchie é utilizado o sedimento para visualização de parasitas intestinais, mais precisamente *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* e *Cystoisospora belli*, de forma a observar a parede autofluorescente dos oocistos. Uma fluorescência azul intensa é obtida através de filtros Ultravioleta (UV), de forma a identificar o coccídeo. As amostras devem ser sempre observadas no microscópio ótico convencional e depois no microscópio de fluorescência (17,23).

### - Método Kato-Katz

O método Kato-Katz é um teste semi-quantitativo que tem como objetivo quantificar *Schistosomas* intestinais numa determinada quantidade de amostra de fezes sem tratamento (22).

Através de um filtro de nylon, a amostra é filtrada e apenas são recolhidos os sedimentos mais reduzidos. De seguida uma quantidade estabelecida de amostra é colocada numa lâmina juntamente com uma porção de solução gelatinosa de glicerina, proporcionando um clareio através do verde malaquite que reduz a luminosidade da amostra permitindo um maior contraste. Desta forma, promove a descoloração das formas parasitárias (22).



Figura 2.15 - Técnica Kato-Katz.

### - Técnica de pesquisa de larvas em cultura

Na secção de parasitologia do LMCBM, as amostras provêm principalmente das consultas de nefrologia, transplantados, infeciologia e consulta de risco de infeção na imunomodulação (CRINI).

Esta técnica tem como objetivo a deteção de *Strongyloides stercoralis* e Ancylostomidae, assim como a sua identificação morfológica. Consiste na colocação da amostra de fezes sem tratamento, numa placa de Petri com meio de cultura (agar, extrato de carne, peptona e NaCl) que é selada e incubada à temperatura ambiente durante 7 dias. As placas são observadas em microscópio invertido (24).

Quando positiva, a presença de larvas é revelada observando rastos de colónias bacterianas fecais no meio de cultura (24).

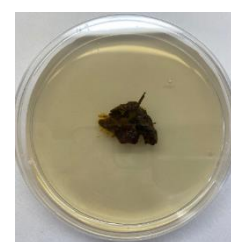


Figura 2.17 - Técnica de pesquisa de larvas em cultura.

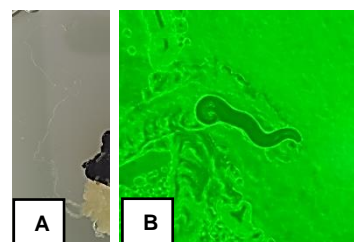


Figura 2.16 - Observação macroscópica e microscópica: A - Indícios da presença de larvas; B - *Strongyloides*.

### - Coloração de Giemsa

Esta coloração pertence à coloração de Romanowsky. No LMCBM é utilizada principalmente para diferenciar células em amostras biológicas, aplicando-se em amostras de sangue, tanto em esfregaços de sangue periférico como em gota espessa (17,25).

A **gota espessa** é considerada uma técnica de grande sensibilidade quando comparada com o esfregaço de sangue periférico. Desta forma, é utilizada no diagnóstico da malária. É necessário um microscopista experiente para observação de resultados (17,25).

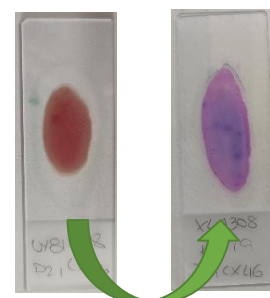


Figura 2.18 - Técnica de gota espessa.

Nesta técnica, o procedimento inicia-se com a observação microscópica da amostra de sangue numa lâmina sem qualquer tipo de fixação, corada previamente com coloração 10% Giemsa, possibilitando a diferenciação entre as espécies de *Plasmodium* spp. (protozoário causador da Malária). A lâmina com a amostra é observada na presença de glóbulos vermelhos (ausência de fixação) (17,20,25).

Em caso de uma amostra ser positiva, é realizado um **esfregaço de sangue periférico** que permite separar melhor a amostra, detetar, identificar espécies e quantificar a parasitemia em número de parasitas por  $\mu\text{L}$  sangue). Esta técnica dá-se antes da aplicação da coloração de Giemsa, através de uma pré-fixação da amostra com metanol, sendo posteriormente aplicada uma solução fosfatada de azul de metileno. Este tratamento, resulta na lise dos glóbulos vermelhos, pelo que deixam de ser observados ao microscópio (17,25,26).

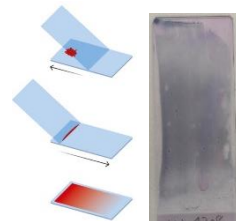


Figura 2.19 - Técnica de esfregaço de sangue periférico.

#### - Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

Para além da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen convencional, existe ainda a técnica de coloração manual de Ziehl-Neelsen modificada, com objetivo de pesquisar coccídea. Esta técnica consiste num esfregaço não muito espesso, que é fixado com metanol, corado com fucsina *Kinyoun*, descorado com solução álcool / ácido (1% HCl em etanol) e por último, corado com azul de metileno (27).



Figura 2.20 - Coloração de Ziehl-Neelsen modificada.

#### 🔍 **Micologia:**

O exame microscópico em micologia é essencial para a identificação de fungos, de acordo com as suas estruturas morfológicas (5,17).

#### - Exame a fresco

Na área da micologia, em particular, o exame a fresco tem o objetivo de observar a existência ou ausência de hifas filamentosas ou leveduras, sendo efetuado diretamente a partir da amostra biológica (15).

#### - Técnica da fita cola

A **técnica da fita cola** consiste na adesão de fungos filamentosos na fita cola, aplicando-a de seguida numa lâmina de vidro com um corante, solução de azul de lactofenol, de forma a evidenciar mais os propágulos reprodutores para caracterização do fungo (28).



Figura 2.21 - Técnica da fita cola.

#### 2.1.1.4.2 Exame Cultural *In Vitro*

O sucesso dos métodos de cultura é definido pela inclusão dos nutrientes propícios ao crescimento dos microrganismos nos meios de cultura, uma colheita e transportes adequados e boas práticas microbiológicas (5).

Existem meios de culturas seletivos, que foram desenvolvidos para suprimir a presença de microrganismos em locais anatómicos não estéreis (exemplo: fezes) e para permitir o isolamento em cultura dos microrganismos clinicamente importantes (5,17,29).

A imunidade inata e adaptativa do paciente pode inibir o microrganismo patogénico, logo, é necessário aplicar as técnicas de cultura adequadas (5).

Para o sucesso do processamento de amostras, este deve ser sempre feito em ambiente asséptico, protegendo o operador dos aerossóis, minimizando a exposição aos agentes patogénicos, protegendo os produtos biológicos de contaminações e o ambiente de trabalho (13).

Neste laboratório, para além do “Manual de Colheitas”, existem ainda procedimentos técnicos para cada amostra referindo os meios de cultura, técnica de sementeira e tempo de incubação para cada uma, como apresentado no anexo 1.

##### **Tipos de Meios de Cultura**

Os meios de cultura podem ser subdivididos em três categorias:

- não seletivos enriquecidos, sustentam o crescimento da maioria dos microrganismos sem requisitos de crescimento fastidiosos;
- seletivos, recuperam organismos específicos que podem estar presentes na mistura de outros organismos através de suplementos que inibem, suprimindo o crescimento de organismos não desejados;
- diferenciais, a adição de elementos específicos permite a identificação de microrganismos numa mistura (5,29).

Na tabela em apêndice 1 podem ser observados os diferentes meios utilizados de acordo com as suas características e objetivos. Existem, ainda, meios de transporte adequados às diversas amostras e meios próprios utilizados no TSA (5,30).

##### **Tipos de Sementeira**

As inoculações das amostras biológicas nos meios de cultura dependem do objetivo e do produto biológico.

No laboratório de microbiologia, as técnicas de inoculação mais frequentes são:

- Sementeira por esgotamento semi-quantitativo (ansa de 1µL) para amostras de urina por técnicas não invasivas (jato médio, saco pediátrico, cateter de foley);
- Sementeira por esgotamento por quadrantes (ansa de 10µL) para exame micológico e para a maioria das restantes amostras;

- Sementeira de espalhamento com zaragatoa para antibiogramas manuais (preenchimento de toda a placa de Petri com a amostra);
- Sementeira por inundação para as amostras de LCR (29,31).



Figura 2.22 - Técnicas de inoculação: por esgotamento semi-quantitativo (A), por quadrantes (B) e por inundação (C) (Fonte: Microbe Notes).

No anexo 1 encontram-se todas as especificações para um correto processamento de amostras biológicas, tendo em conta os diferentes exames a realizar.

Posteriormente, no LMCBM, todas as placas inoculadas são incubadas às temperaturas e atmosferas ótimas de crescimento conforme os microrganismos em estudo.

Para o crescimento de microrganismos anaeróbios e microaerófilos é necessário um depósito com geradores que permitem obter a atmosfera desejada:

- CampyGen™ Compact Sachet, gera gás adequado à microaerofilia (32);  
O ácido ascórbico reage quando entra em contato com o ar, absorvendo o oxigénio ao mesmo tempo que produz dióxido de carbono. Embora seja uma reação exotérmica, nunca excede os 65°C (32).

- AnaeroGen™, gera condições atmosféricas ideais para o crescimento de microrganismos anaeróbios (33).

O ácido ascórbico e o carvão ativado reagem quando entram em contato com o ar, onde o oxigénio é rapidamente absorvido e o dióxido de carbono é produzido, representando cerca de 8% a 14%, dependendo do frasco onde estiver contido (33).

O indicador químico anaeróbico constitui um controlo, de forma a averiguar se realmente existem condições anaeróbicas, por meio da cor apresentada (34).

O tempo de incubação varia de acordo com os microrganismos, contudo, a maioria necessita somente de 24 a 48 horas. No caso dos microrganismos anaeróbios poderá ser necessário um tempo superior de incubação (13)(12)(31).

As amostras colhidas em meio Portagerm devem ser semeadas em:

- Meio de Gelose de Sangue (GS) e Macconkey (MAC) para incubação em aerobiose;
- Meio GS com um disco de netilmicina para incubação em aerotolerância (controlo);



Figura 2.23 - Condições para um ambiente anaeróbico (Fonte: Thermo Fisher Scientific).

- Meio Columbia Hemina vit K(HK) + 5% sangue (bactérias fastidiosas e detecção de hemólise) com disco de netilmicina (anaeróbios apresentam resistência intrínseca, facilitando a pesquisa) e em meio Tioglicolato para incubação durante 7 dias em anaerobiose nas jarras conforme o descrito em cima, juntamente com um indicador (cultura de *Pseudomonas* em GS, caso não exista crescimento é confirmada a presença da atmosfera de anaerobiose) (35).

Se resultar numa cultura positiva em anaerobiose (observação a cada 48 horas), as colónias com distintas morfologias devem ser concomitantemente reisoladas para anaerobiose e aerobiose em Columbia HK e GS, respetivamente. A ausência de crescimento na placa incubada em aerobiose e crescimento apenas em anaerobiose confirma a presença de um anaeróbio estrito.

Podem ser realizadas passagens dos meios líquidos (PML) para meio sólido caso o meio líquido se encontre turvo e não exista crescimento em placa de Petri da cultura primária para pesquisa de organismos fastidiosos ou anaeróbios.

A netilmicina é um antibiótico, hidrossolúvel do grupo dos aminoglicosídeos, de atuação rápida contra uma vasta gama de bactérias patogénicas Gram- aeróbicas, ligando-se ao ribossoma bacteriano e assim, inibindo irreversivelmente a síntese proteica normal dos organismos, resultando na formação de proteínas defeituosas (36).

Assim, estes microrganismos anaeróbios podem ser recuperados em infeções polimicrobianas e pesquisados através de condições específicas, essenciais para o diagnóstico preciso, para o tratamento eficaz e para a prevenção de complicações associadas a infeções anaeróbicas, visto que existe uma vasta população anaeróbia na microbiota humano (35).

No Apêndice 2 podem ser observados dois esquemas para melhor compreensão do procedimento de pesquisa de microrganismos anaeróbicos.

#### 2.1.1.4.3 Detecção de microrganismos

Os métodos de detecção de microrganismos são uma alternativa rápida para os testes de patogénicos, englobando biossensores.

## BACT/ALERT Virtuo® (Biomérieux®)



Figura 2.24 - Equipamento BACT/ALERT Virtuo (Fonte: Biomérieux).

Os sistemas de deteção microbiana BACT/ALERT® são utilizados para determinar a presença de microrganismos em amostras de sangue colhidas a partir de um doente no qual se suspeita de bacteriemia. O frasco de hemocultura contém um meio de cultura de neutralização antimicrobiana fastidiosa com condições nutritivas e ambientais adequadas aos microrganismos geralmente detetados em infeções da corrente sanguínea (37).

Os frascos de hemocultura utilizados no LMCBM são:

- BACT/ALERT® PF Plus, frasco com tampa amarela adequada a amostras biológicas de pediatria, com objetivo de detetar os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (bactérias e leveduras) no sangue (38);
- BACT/ALERT® FN Plus, frasco com tampa laranja adequada a amostras biológicas para deteção de microrganismos anaeróbios no sangue e outros fluidos orgânicos normalmente estéreis (39);
- BACT/ALERT® FA Plus, frasco com tampa verde adequada a amostras biológicas para deteção de microrganismos aeróbios no sangue e outros fluidos orgânicos normalmente estéreis (40).



Figura 2.25 - Garrafas de hemocultura BACT/ALERT (Fonte: Biomérieux).

Se existirem microrganismos na amostra testada é libertado dióxido de carbono, uma vez que os microrganismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura, provocando uma viragem de cor do sensor de escura (verde) para clara (bege), localizado no fundo de cada frasco de hemocultura, como representado na figura abaixo. Isto acontece, pois, um díodo emissor de luz (LED) projeta luz sobre o sensor. Um fotodetector mede a luz refletida, permitindo observar que quanto mais dióxido de carbono for produzido, maior é a quantidade de luz refletida, o que permitirá dar um resultado de uma amostra positiva. Se o nível de dióxido de carbono não se alterar significativamente após um determinado número de dias em condições ótimas, a amostra é considerada negativa (41).

Assim, os frascos de hemocultura são colocados no equipamento, onde são incubados e são medidas as refletâncias a cada 10 minutos (41).

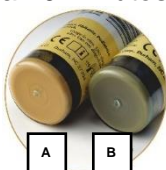


Figura 2.26 - Resultados visuais obtidas pelas garrafas BACT/ALERT para deteção de microrganismos: A - Positivo; B - Negativo (Fonte: Biomérieux).

### **BACTEC 9050 (Becton Dickinson)**



Figura 2.27 - Equipamento BACTEC 9050 (Fonte: Becton Dickinson).

Após inoculação, os microrganismos presentes no meio de cultura metabolizam os nutrientes disponíveis libertando dióxido de carbono no meio tal como no equipamento anterior. Contudo, este é utilizado para a deteção de micobactérias no sangue e medula (42).

Os frascos de hemocultura utilizados são os BD BACTEC™ Myco/F Lytic Medium. Este meio de cultura é o adequado para o crescimento de micobactérias (43)



Figura 2.28 - Garrafas de hemocultura BD BACTEC™ Myco/F Lytic Medium (Fonte: Becton Dickinson).

### **BD BACTEC™ MGIT™ 960**



Figura 2.29 - Equipamento BACTEC MGIT 960 (Fonte: Becton Dickinson).

O BD BACTEC MGIT 960 é um equipamento automatizado com objetivo de isolar micobactérias. Os tubos de cultura têm um composto fluorescente, embebido em silicone, que é sensível à presença de oxigénio dissolvido no meio (44,45).

Para isolar as micobactérias de outros microrganismos presentes na flora microbiana, é necessário realizar previamente uma descontaminação da amostra, no entanto não é necessária em amostras de LCR ou provenientes de locais anatómicos estéreis (desde que o exame bacteriológico tenha sido negativo). Neste laboratório em particular, utiliza-se Hidróxido de Sódio (NaOH) para potencializar as micobactérias e eliminar outros microrganismos presentes, durante 15 minutos, de forma a deixar os reagentes atuarem. Contudo, não pode exceder este intervalo de tempo, pois existe o risco das micobactérias não resistirem e serem eliminadas juntamente com os restantes microrganismos. Após descontaminada, utiliza-se um tampão para estabilizar o pH e é colocado o sedimento no tubo indicador de crescimento de micobactérias (*Mycobacteria Growth Indicator Tube* - MGIT). O equipamento será o responsável por detetar a presença ou ausência de micobactérias nos MGIT até 56 dias de incubação (ou menos, em caso de positivo antecipadamente) (44–46).

Durante esta incubação, as micobactérias vão consumir o oxigénio presente, provocando uma diminuição do mesmo. O detetor do equipamento identifica esse decréscimo através de uma luz que interseja os MGIT contendo as amostras. Com o crescimento gradual das micobactérias, os componentes do meio vão-se degradando pelo consumo realizado pelas mesmas, formando, desta forma, um crescimento exponencial, representado por  $2^x$  (multiplicação por divisão binária). Ao detetar a

descida de oxigênio, o equipamento forma uma fluorescência, como representado na figura abaixo. A medição acontece a cada 60 minutos (44).

Caso existam micobactérias é exibida uma cor vermelha, caso contrário, é emitida uma cor verde (44).

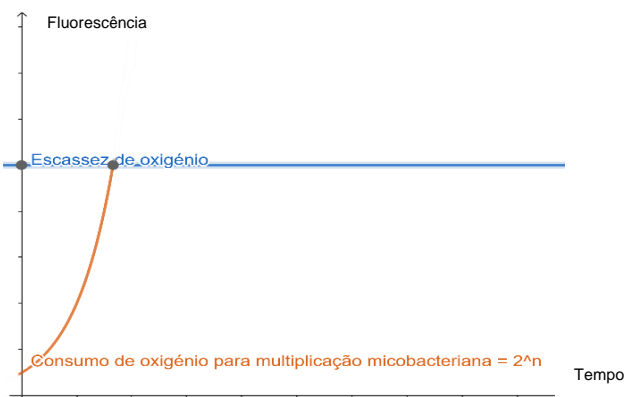


Figura 2.30 - Gráfico representativo da fluorescência ao longo do tempo de incubação de micobactérias no equipamento: Há multiplicação de micobactérias através do consumo de oxigênio. Quando o oxigênio deixa de estar presente, o crescimento microbiológico termina (Fonte: Geogebra).

No caso de uma amostra ser positiva, então é feita uma mistura em plasma de coelho, para serem realizadas lâminas com coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen, e são semeadas em meio de cultura de GS (44).

#### 2.1.1.4.4 Identificação de microrganismos

Existem vários testes que auxiliam o processo de identificação, permitindo realizar uma identificação presuntiva dos microrganismos em estudo, com base nas características metabólicas, nutricionais e em reações antígeno-anticorpo. Contudo existem já técnicas automatizadas que nos indicam automaticamente qual o microrganismo presente (13,31).

O exame cultural é uma forma de identificar microrganismos isolando-os em culturas puras. Os meios de cultura sólidos permitem a observação das colônias, da sua morfologia e de reações bioquímicas específicas. Já os meios líquidos têm o objetivo de enriquecer o meio para promover o crescimento de microrganismos que estão em baixa quantidade (13,31).

Cada microrganismo tem as suas próprias características que permitem selecionar o meio mais propício ao seu crescimento. Desta forma, nos apêndices 3, 4 e 5 estão expostas as características dos diversos microrganismos para identificação isolada em cultura e em microscopia.

#### Testes Bioquímicos

Vários testes complementam a identificação de microrganismos. No LMCBM são utilizados com regularidade os seguintes testes bioquímicos:

- **Catalase**

O teste da catalase tem como objetivo distinguir dois géneros de bactérias Gram+, os *Staphylococcus* spp. (catálase positiva) e os *Streptococcus* spp. (catálase negativa) (13).

Baseia-se na deteção da enzima catalase, que tem a capacidade de converter o peróxido de hidrogénio (3%) em oxigénio e água, através da colocação de uma gota de peróxido de hidrogénio e de uma colónia isolada em meio de cultura numa lâmina. A reação positiva indica a presença de catalase, a qual é evidenciada pela rápida produção de bolhas (13,29).

- **Oxidase**

O teste da oxidase tem como objetivo detetar a presença da enzima citocromo oxidase, que participa no transporte de eletrões de um dador para um aceitador, desta forma, é possível fazer uma caracterização de bacilos Gram-, permitindo diferenciar microrganismos da família das Enterobacteriaceae (oxidase negativa) de outros bacilos pertencentes aos géneros *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. (oxidase positiva), através da utilização de dihidroclorato de tetrametil p-fenilenodiamina (aceitador de eletrões) numa colónia isolada (12).

A reação positiva indica a presença da enzima oxidase, a qual é evidenciada pela oxidação do reagente, originando uma cor roxa. Já a ausência de oxidase, não há alteração da cor (12).

- **Teste da coagulase em tubo (pesquisa e coagulase livre) e Teste de aglutinação para identificação rápida de *S.aureus***


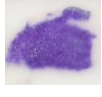

O teste tem como objetivo distinguir *Staphylococcus aureus* dos restantes *Staphylococcus* (coagulase negativa), através da aplicação de colónias bacterianas em suspensão de plasma (fibrinogénio) (47).

A enzima coagulase atua como um fator de virulência em alguns organismos, permitindo a conversão de fibrinogénio em fibrina, afetando a coagulação normal do sangue (47).

A reação positiva indica a presença da enzima coagulase (ou fator coagulante) ligada na superfície da parede celular do microrganismo, que reagindo com o fibrinogénio do plasma, forma ligações de fibrina, provocando grumos visíveis, confirmando a presença de *S. aureus*. Na ausência de coágulos visíveis dentro de 10 segundos permite a confirmação de *Staphylococcus* coagulase negativa (29,47).

Em alternativa pode ser utilizado o teste rápido *Staphylococcus aureus* - SLIDEX®Staph Plus, para distinção entre *S.aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa, pela deteção do antígeno de afinidade ao fibrinogénio, proteína A e polissacarídeos capsulares de *S.aureus* por aglutinação em látex (47).

Tabela 2.1 - Tabela resumo dos testes bioquímicos utilizados no LMBM (Fonte: Tille, 2014; Sperber et al., 1975).

Prova Bioquímica	Objetivo	Reação Positiva	Exemplos Microrganismos	Ilustração Resultado Positivo
Catalase	Deteção da enzima catalase	Libertação de gás (formação de bolhas)	(+): <i>Staphylococcus</i> spp. (-): <i>Streptococcus</i> spp.	
Oxidase	Deteção da enzima citocromo oxidase	Coloração roxa	(+): <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (+): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-): Outros cocos Gram- (-): <i>Enterobacteriaceae</i>	
Aglutinação	Deteção da enzima coagulase	Formação de um coágulo	(+): <i>S.aureus</i> (-): Outros <i>Staphylococcus</i> spp.	

### Vitek® MS Prime (BioMérieux®)



Figura 2.31 - Equipamento Vitek MS Prime (Fonte: Biomérieux).

Este equipamento utiliza a tecnologia de espectrometria de massa por ionização/ dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* - MALDI-TOF MS) para identificação microbiana a partir de colónias isoladas valorizadas consoante os parâmetros de referência (48).

Através do Vitek® PickMe™ são aplicadas no slide, a estirpe padrão e as colónias a identificar. Este processo é faseado por 4 etapas demonstradas no esquema abaixo (49).



Figura 2.32 - Materiais necessários para identificação de microrganismos no Vitek MS Prime: A – Kit PickMe™; B - Slide (Fonte: Biomérieux).

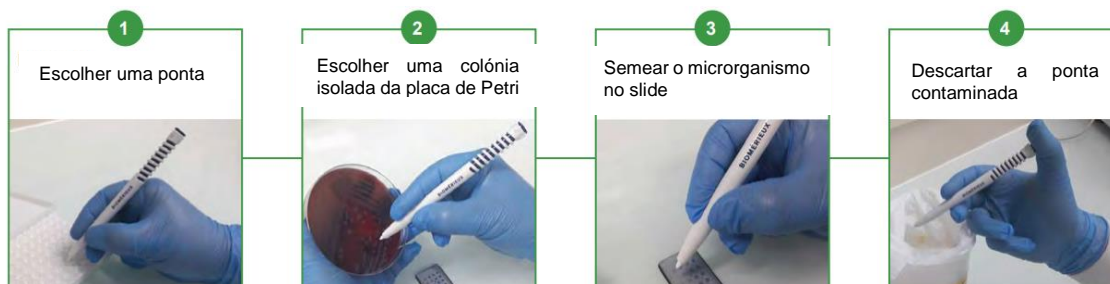


Figura 2.33 - Procedimento para identificação de microrganismo através do Vitek® PickMe™ (Fonte: Biomérieux).

A colónia isolada da amostra inserida no slide é envolvida por uma matriz, responsável pela absorção de energia durante o processo de identificação. No caso da identificação

de fungos adiciona-se previamente o ácido fórmico antes da aplicação da matriz. Após a cristalização das misturas aplicadas nos micropoços do slide, este é inserido no equipamento Vitek MS Prime. O processo de identificação passa pela aplicação de um raio laser que provoca a ionização da amostra. A libertação de proteínas que são aceleradas por uma carga elétrica são posteriormente separadas consoante a relação massa/carga, num tubo de voo em vácuo, permitindo medir o tempo de voo após a passagem do anel de elétrodos. O tempo de voo é registado pela deteção das proteínas por um sensor, criando um espetro que representa o perfil proteico de cada isolado. Por fim, perfil obtido é comparado com uma base de dados para a sua identificação (29,48).

### **Vitek® 2 (BioMérieux®)**



Figura 2.35 - Equipamento Vitek 2 (Fonte: Biomérieux).

O Sistema semi-automatizado Vitek® 2, tem o objetivo identificar microrganismos e realizar o TSA, através de cartas teste que contêm vários poços com substratos bioquímicos (cartas de identificação) ou agentes antimicrobianos (cartas de antibiograma mencionados mais à frente) (16,50).

Uma suspensão é feita com NaCl 0,45% e com as colónias que se pretendem estudar. Esta suspensão deverá ter uma turvação entre 0,50 e 0,63 de acordo com a escala McFarland, através do dispositivo *DensiCHECK™*. Posteriormente, as suspensões são colocadas na cassete *Smart Carrier Station™*, e associadas informaticamente às respetivas cartas de teste. Em seguida o equipamento realiza a inoculação das suspensões nas cartas e são incubadas a  $35,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os resultados são lidos a cada 15 minutos através de um sistema ótico de transmitância (16,50).

Embora este sistema possa ser utilizado para a identificação dos vários microrganismos são utilizadas apenas as cartas de identificação de bacilos G- em particular para confirmação de *E.coli* e *Shigella spp.* isoladas em amostras de fezes e previamente identificadas por Vitek MS prime (51).

#### 2.1.1.4.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os TSA permitem obter o perfil de suscetibilidade dos microrganismos a uma batéria de fármacos. Esta é definida por entidades reconhecidas pela comunidade científica, como a *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, norma de todos os laboratórios europeus (a seguida pelo LMCBM), e do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, norma americana (52).



Figura 2.34 - Dispositivo de medição de densidade DensiCHECK (Fonte: Biomerieux).







Figura 2.36 - Carta para identificação de microrganismos, TSA no Vitek 2 (Fonte: Biomerieux).




O TSA tem um papel fundamental na orientação clínica da escolha do melhor tratamento de acordo com o perfil de suscetibilidade do microrganismo, sendo que um tratamento direcionado é importante na redução da resistência aos antimicrobianos, permitindo detectar e monitorizar tendências nas resistências (5,29).

A virulência de um microrganismo, o local de infecção e a capacidade do doente responder à mesma, influenciam a interação patógeno-hospedeiro, e também devem ser considerados na escolha de antibióticos (5).

Os TSA podem dar um resultado qualitativo ou quantitativo. No primeiro caso, o microrganismo é classificado como resistente ou sensível, dependendo do local de corte, e no segundo é determinada uma concentração mínima inibitória (CMI) do fármaco em teste, indicando a concentração mínima para a qual um agente antimicrobiano tem a capacidade de inibir o microrganismo infeccioso no local da infecção. Na tabela a seguir resumem-se os diferentes tipos de TSA (usadas no LMCBM), dentro das categorias anteriormente descritas (29,53).

Tabela 2.2 - Tipos de TSA utilizados no LMCBM (fonte: Tille PM, 2017; Ligozzi et al., 2012; Garrote et al., 2000; Biomérieux; GeneXpert; Etest; Bruker Daltonics).

Métodos		Particularidades	Ilustração
Qualitativo Resultado: Resistente ou Sensível	Método de Difusão em Disco (Kirby-Bauer)	Discos com determinada concentração de antimicrobiano são colocados no meio de cultura Muller-Hilton, previamente inoculado com uma suspensão bacteriana (0,5 McFarland).  Após incubação, observa-se um halo de inibição (diâmetro medido em milímetros).	
	Vitek 2	Uma suspensão bacteriana de turvação definida é inoculada pelo equipamento nas cartas* de TSA (especificações apresentadas nos anexos 2 a 6).	
	Testes de amplificação a ácidos nucleicos	<i>Staphylococcus aureus</i> – detecção da resistência à metilina**	
		Deteção das Carbapenemases** - quando presentes os genes que codificam a produção destas enzimas, conferem resistência aos Carbapenemases	

		<p><i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p>Importante para identificar e determinar a suscetibilidade à Rifampicina</p>	
<p><b>Semi-quantitativo</b></p> <p>Resultado: CMI (µg/mL)</p>	<p><b>Método de Gradiente de Difusão (Etest®)</b></p>	<p>Impregnação de uma tira (com escala numérica) com diferentes concentrações de antibióticos, aplicada em meio de cultura apropriada de acordo com o microrganismo (Mueller Hinton/RPMI***) previamente inoculado com a suspensão bacteriana. Após incubação, é formada uma elipse que intersesta a escala de leitura da CMI na tira.</p>	
	<p><b>Método de Microdiluição em meio líquido</b></p>	<p>Uma suspensão bacteriana de turvação definida é adicionada ao meio de cultura líquido Mueller Hinton e inoculada em micropoços contendo concentrações conhecidas de antibiótico(54,55)</p> <p>Após incubação, a CMI é determinada no primeiro micropoço que não apresenta turvação.</p>	

\*Esta carta contém 64 micropoços com concentrações conhecidas de antibióticos.

\*\*Informação importante para o internamento do doente em cuidados intensivos (necessidade de isolamento quando detetada resistência)

Existe ainda o teste *Mycoplasma* IST 2, com finalidade de identificar e determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos de *Ureaplasma* spp. e de *Mycoplasma hominis*. O procedimento e condições de leitura do teste podem ser observados no apêndice 6 (56).

#### 2.1.1.4.6 Deteção de antígenos

Chama-se **antígeno** a qualquer substância capaz de se ligar a um recetor dos linfócitos B (imunoglobulinas) ou dos linfócitos T capaz de estimular uma resposta imunológica (57).

Chama-se **anticorpo** a qualquer substância que é reconhecida especificamente pelos recetores (de antígeno) dos linfócitos B e T, que resulta do estímulo que o antígeno provoca no sistema imunológico. Desta forma, a deteção de antígenos indica a presença do microrganismo patogénico na amostra (57).

##### 2.1.1.4.6.1 Pesquisa de antígenos por imunocromatografia

O teste imunocromatográfico (TIC) de fluxo lateral ou também designado por teste rápido baseia-se na deteção de agentes específicos em amostras biológicas. Tem sido cada vez mais útil para o diagnóstico, já que é bastante fácil de realizar, sem

necessidade de grandes recursos tecnológicos e é possível ser efetuado mesmo que o microrganismo não esteja viável (58).

Este teste consiste na diluição da amostra biológica num tampão fornecido, os quais migrarão sob uma membrana de nitrocelulose por escoamento de fluxo lateral. Se a amostra contiver antígenos do microrganismo que se pretende estudar, a linha de teste, marcada com anticorpos, vai produzir uma coloração devido à ligação entre estes dois elementos. Uma outra imunorreacção irá acontecer na linha de controlo, onde as restantes partículas ligam-se ao anticorpo imobilizado, formando outra linha colorida, de modo a validar o teste (58).

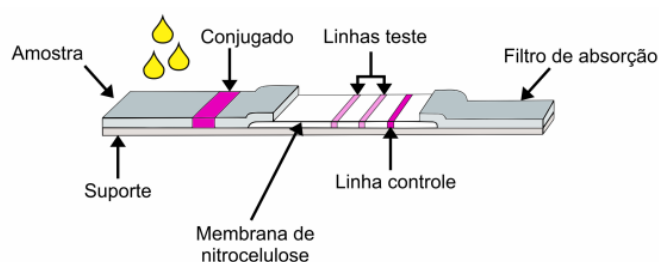


Figura 2.37 - Ilustração dos componentes do TIC de fluxo lateral (Fonte: Labtest).

Se o teste for negativo, apenas a linha de controlo apresenta coloração, devido à inexistência de ligações. Abaixo encontra-se uma ilustração que reflete a interpretação dos resultados visuais.

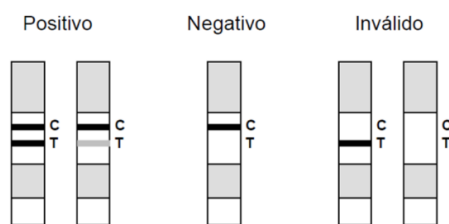


Figura 2.38 - Interpretação de resultados de TIC (Fonte: Abbott).

Alguns exemplos de testes rápidos no LMCBM antes do exame cultural, **diretamente da amostra** podem ser observados no anexo 7 e alguns exemplos de testes rápidos no LMCBM depois do exame cultural, **a partir de colónias isoladas** podem ser observados no anexo 8.

#### 2.1.1.4.6.2 Pesquisa de antígenos por imunofluorescência

O diagnóstico de infeções causadas por *Legionella* pode ser feito através da coloração de anticorpos por fluorescência direta, por exame cultural ou através de testes rápidos de antígeno urinário (aplicada somente para *L. pneumophila* sorogrupo 1) (59).

A *L. pneumophila* é um agente etiológico de duas doenças: pneumonia *Legionella* (doença do legionário), uma infeção respiratória aguda e febre de Pontiac, não pneumónica, auto-limitada (59).

- **MONOFLUO™ Legionella pneumophila IFA Test Kit – 32514 (BIO-RAD)**

É um teste de imunofluorescência indireta (*Indirect Immunofluorescent Assay* - IFA) com objetivo de diagnosticar a doença dos legionários, através da detecção e identificação de *Legionella pneumophila* (apenas serogrupo 1) em amostras clínicas respiratórias, Lavado Broncoalveolar (LBA) e urina, e em cultura (amostras respiratórias e urina) (59).



Figura 2.39 - MONOFLUO™ Legionella pneumophila IFA Test Kit – 32514 (Fonte: BIO-RAD).

O reagente de coloração Anti-*Legionella pneumophila* contém um único anticorpo monoclonal que é marcado com isotiocianato de fluoresceína, que reage com uma proteína presente na membrana exterior de todos os serogrupos (59).

Os esfregaços são preparados em lâminas e é realizada uma coloração. O anticorpo monoclonal marcado neste reagente liga-se imunologicamente a qualquer *L.pneumophila* existente no esfregaço. É realizado um enxaguamento que permite eliminar o anticorpo não ligado. Quando a amostra é observada ao microscópio, a *L.pneumophila* aparece sob forma de bacilos ou cocobacilos intensamente fluorescentes em verde, já os restantes organismos são observados a vermelho escuro ou dourado baço, devido à contra-coloração (45,59).

#### 2.1.1.4.7 Testes à amplificação de ácidos nucleicos (TAAN)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que tem como objetivo a ampliação de uma sequência específica de ácidos nucleicos alvo, permitindo o isolamento através da clonagem de uma sequência genética de interesse (60).

Normalmente, uma PCR é constituída por 3 etapas:

- **Desnaturação**, a amostra é aquecida a 95°C, dividindo a dupla cadeia de ácido desoxirribonucleico (DNA) em 2 cadeias simples;
- **Hibridização ou adesão**, a temperatura diminui para 55°C, permitindo a ligação dos *primers* às sequências específicas de DNA em cada extremidade da sequência alvo.
- **Polimerização ou extensão**, a temperatura é aumentada para 72°C, permitindo que a DNA polimerase expanda os *primers* pela adição de trifosfato desoxirribonucleotídeos (dNTPs,

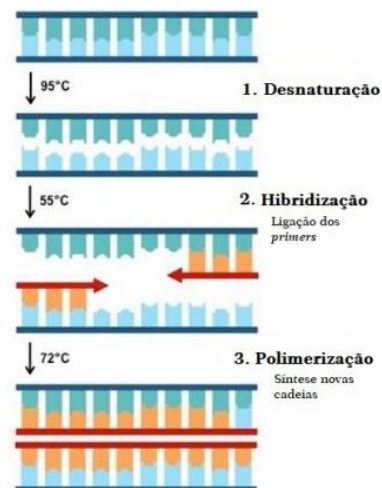


Figura 2.40 - Etapas de PCR (fonte: Biomérieux).

constituída por uma base azotada, um açúcar e 3 grupos fosfatos) para criar uma nova cadeia de DNA, multiplicando a quantidade de DNA na reação (60).



### GeneXpert® XVI (Cepheid®)



Figura 2.42 - GeneXpert® XVI  
(Fonte: Cepheid).

Constitui um equipamento completo, realizando todo o procedimento desde a extração até à deteção e diferenciação automática de ácidos nucleicos de microrganismos específicos, através do teste PCR em tempo real qualitativo *in vitro* (64).

Esta tecnologia destina-se a vários tipos de amostras, sendo as utilizadas no LMBM, os cartuchos de:

- **CT/NG** (Deteção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* - 90 minutos);
- **Carba-R** (Deteção de genes de resistência aos carbapenemases que codificam KPC, NDM, VIM, OXA-48 e IMP - 50 minutos de isolados, zaragatoas retais ou perirretais);
- **Cov-2/Flu/RSV plus** (Deteção dos vírus causadores da COVID-19, Gripe A, Gripe B e RSV, com a adição de um terceiro gene para SARS-CoV-2 - 25 minutos);
- **MTB/RIF ultra** (Deteção de mutações de resistência a *Mycobacterium tuberculosis* e Rifampicina - 2 horas);
- **Flu/RSV** (Deteção e diferenciação de Gripe A, Gripe B e VSR - 20 minutos);
- **Cov-2 plus** (Deteção do atual coronavírus pandémico SARS-CoV-2 - 20 minutos);
- **MRSA NxG** (Testes de vigilância ativa de MRSA - 45 minutos);
- **C. difficile BT** (Deteção de *Clostridium difficile* com resultados independentes de toxina binária e diferenciação da estirpe 027 - 45 minutos) (65).

Todo o procedimento acontece dentro de um cartucho inserido no equipamento, o qual contém uma válvula responsável pela condução dos reagentes/amostra que serão capturados e/ou libertados por uma pipeta. Numa primeira fase a amostra é filtrada, retendo os microrganismos. De seguida é produzido um sinal acústico, proporcionando energia suficiente para libertar o material genético dos microrganismos. Assim, torna-se possível a realização ciclos de PCR. O resultado é dado pela iluminação da solução com 10 fluorescências, que permitem confirmar a presença de DNA/RNA alvo (64).



Figura 2.43 - Cartucho do GeneXpert (Fonte: Cepheid).

### **BioRobot EZ1 (QIAGEN®)**



Figura 2.44 - BioRobot EZ1 (Fonte: QIAGEN).

Constitui um extrator de ácidos nucleicos, de forma a preparar a amostra biológica antes da amplificação por PCR através da purificação total de ácidos nucleicos usando partículas magnéticas para o diagnóstico *in vitro* (66).

O procedimento automático dá-se através da aspiração e dispensa

de amostra, reagentes e a separação de partículas magnéticas feitas em seis canais com pipetas, conforme o procedimento apresentado na figura ao lado (66).

A tecnologia de partículas magnéticas isola o material genético, purificando-o, pela sua ligação à superfície de sílica das partículas, que através de um íman, são separados dos lisados (67).

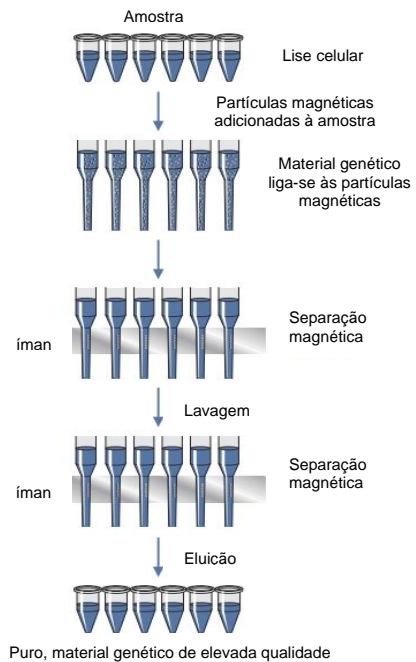


Figura 2.45 - Ilustração do processo de purificação de DNA (Fonte: QIAGEN).

### **Seegene STAR<sup>LET</sup> (Hamilton)**



Figura 2.46 - Seegene STARLET (Fonte: Hamilton).

Extrai os ácidos nucleicos a partir de diferentes tipos de amostras biológicas através da pipetagem automatizada juntamente com esferas magnéticas e prepara a mesma para a técnica de PCR (68).

Esta tecnologia permite a extração e pipetagem quer de até 94 amostras em simultâneo, quer dos respetivos

reagentes de PCR. No LMCBM os painéis utilizados são:

- **Gastrointestinal Panel (Allplex™)**

Através de um ensaio RT-PCR em tempo real é possível detetar e identificar 25 patógenos gastrointestinais, incluindo 6 vírus, 13 bactérias e 6 parasitas em simultâneo (69).

- **Genital Ulcer Assay (Allplex™)**

Através de PCR em tempo real é possível detetar 7 patógenos causadores de úlceras genitais em simultâneo, através de PCR em tempo real, em amostras de sangue total, LCR, urinas ou líquidos de citologia (ThinPrep®), relatando o valor individual de ciclos de vários patógenos num único canal (70).

- **HPV HR Detection (Anyplex™ II)**

Através de um ensaio multiplex PCR em tempo real é possível detetar de forma simultânea, diferenciada e quantifica 14 genótipos de elevado risco de HPV, incluindo o HPV16 e HPV18 que são os que mais implicam maior risco para o cancro cervical, em amostras líquidas de citologia (ThinPrep®) e swab cervical (71).

No Anexo 9 podem ser observados os microrganismos detetados nestes painéis.

- **CFX96 Real Time System (Bio-Rad®)**



Figura 2.47 - CFX96 Real Time System (Fonte: Bio-Rad).

Constitui um termociclador que permite amplificar ácidos nucleicos dependendo dos *primers*, tamanho de amplificação, tipo de enzima e tempo de corrida (61).

Constitui um sistema de deteção de PCR em tempo real, com um módulo de deteção ótica para medir a fluorescência gerada a cada ciclo de amplificação à medida que o *primer* marcado com o fluoróforo se liga à sequência alvo (61,72,73).

- **PANTHER FUSION® (Hologic®)**

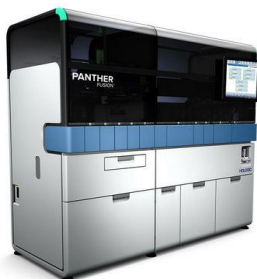


Figura 2.48 - PANTHER FUSION® (Fonte: Hologic).

Constitui um equipamento completo, que realiza a extração de ácidos nucleicos, incubações e amplificação por PCR. O resultado é obtido por um gráfico de fluorescência e ciclos (74).

Esta tecnologia destina-se principalmente a amostras respiratórias, sendo que as utilizadas no LMBM são os kits de:

- **SARS-CoV-2/Flu A/B/RSV** – Deteção qualitativa e diferenciação do SARS-CoV-2, vírus influenza A, vírus influenza B e vírus sincicial respiratório (75);
- **Flu A/B/RSV** – Deteção qualitativa e diferenciação do vírus influenza A, vírus influenza B e vírus sincicial respiratório (76,77);
- **SARS-CoV-2** – Deteção qualitativa do vírus SARS-CoV-2 (78).

## FilmArray™ (Biofire - Biomérieux)



Figura 2.49 - FilmArray™  
(Fonte: Biomérieux)

Constitui um equipamento completo que permite realizar a extração de ácidos nucleicos através da lise celular e purificação por magnetismo, amplificação por PCR multiplex e singleplex. É um sistema fechado, de forma a obter as curvas de *melting*, apenas com a adição da solução hidratante e da amostra (79,80).

No LMCBM são utilizados apenas os Painéis respiratório e de meningites, sobretudo para crianças e doentes em internamento, já que é uma técnica dispendiosa.

- **Painel respiratório** (crianças) – Abrange 20 vírus respiratórios e bactérias que causam infeção ao nível do trato respiratório superior (81,82).
- **Painel meningites/encefalites** (internamento) – Diretamente do líquido cefalorraquidiano é testado 14 patógenos associados a meningites/Encephalitis mais relevantes, incluindo bactérias, vírus e uma levedura (83,84).

Na figura abaixo pode ser observado o procedimento aplicado no equipamento e as etapas por onde a amostra passa até se obter o resultado de deteção dos microrganismos ou não presentes nos painéis.

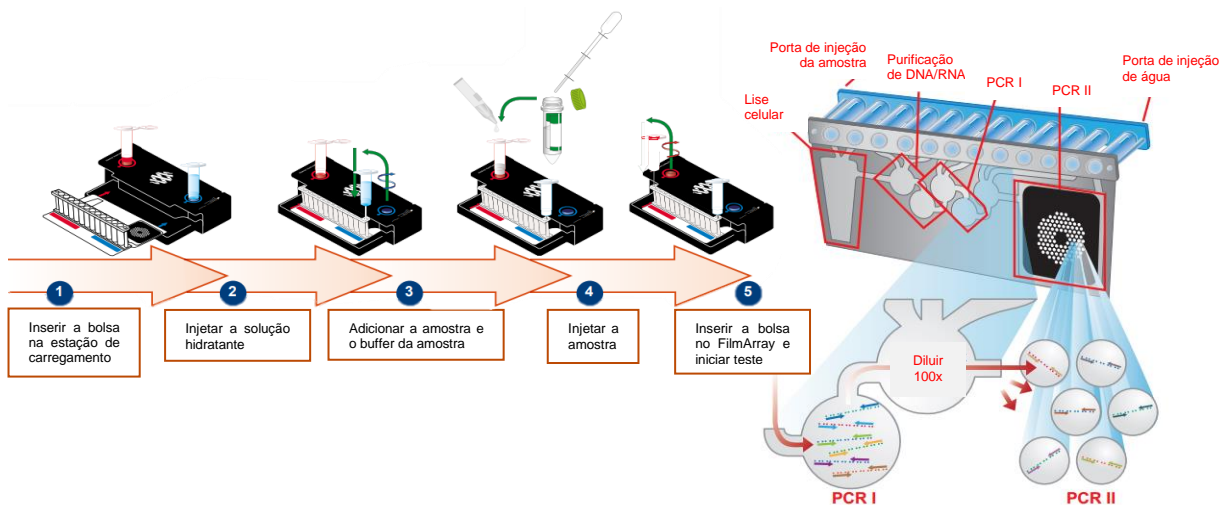


Figura 2.50 - Procedimento aplicado no equipamento FilmArray™ (Fonte: Biomérieux).

No anexo 9 podem ser observados os microrganismos possíveis de detetar em neste equipamento.

## MOBIDING (Sistema Novodiag®) MicroArray (Hologic)



Figura 2.51 - MOBIDING (Sistema Novodiag®) MicroArray (Fonte: Hologic).

Constitui um equipamento para deteção de doenças infecciosas e gestão de resistência antimicrobiana. A combinação das tecnologias microarray e PCR, permite a análise direta da amostra do indivíduo num cartucho para *screening* de um único ou múltiplos patogénicos (85–87). Neste momento, este aparelho está em fase de experimentação no LMCBM, aplicando-se os seguintes

painéis:

- **Painel CarbaR+** - É um teste molecular para detetar qualitativamente as carbapenemases e colistinas resistentes através de amostras retais (88).
- **Painel Parasitas** – É um teste molecular para detetar qualitativamente protozoários, helmintas e microsporidia (89)

O funcionamento deste equipamento dá-se como indicado na figura abaixo.



Figura 2.52 - Procedimento aplicado no equipamento MicroArray (Fonte: Hologic).

## 2.2 Microbiota humano

O feto vive protegido num ambiente estéril. Após o nascimento, o bebé é exposto aos microrganismos da mãe, do meio ambiente e outros, passando a estar colonizado por bactérias, fungos e vírus, formando uma comunidade fundamental na saúde humana, a qual pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais. Esta comunidade é denominada por microbiota ou flora microbiana, que habita na pele, narinas, cavidade oral, intestinos e trato geniturinário. Este e os agentes etiológicos patogénicos diferem de acordo com os locais anatómicos, da epidemiologia, da situação clínica atual e anterior, dos tipos de infeção, da idade, entre outras variantes (90–94).

A flora microbiana desempenha funções importantes para o hospedeiro como na ajuda na digestão dos alimentos, na produção de vitaminas e na proteção do hospedeiro contra microrganismos patogénicos (95–97).

Abaixo pode ser observada uma figura indicativa dos principais microrganismos presentes na microbiota humana nos diferentes locais anatómicos.

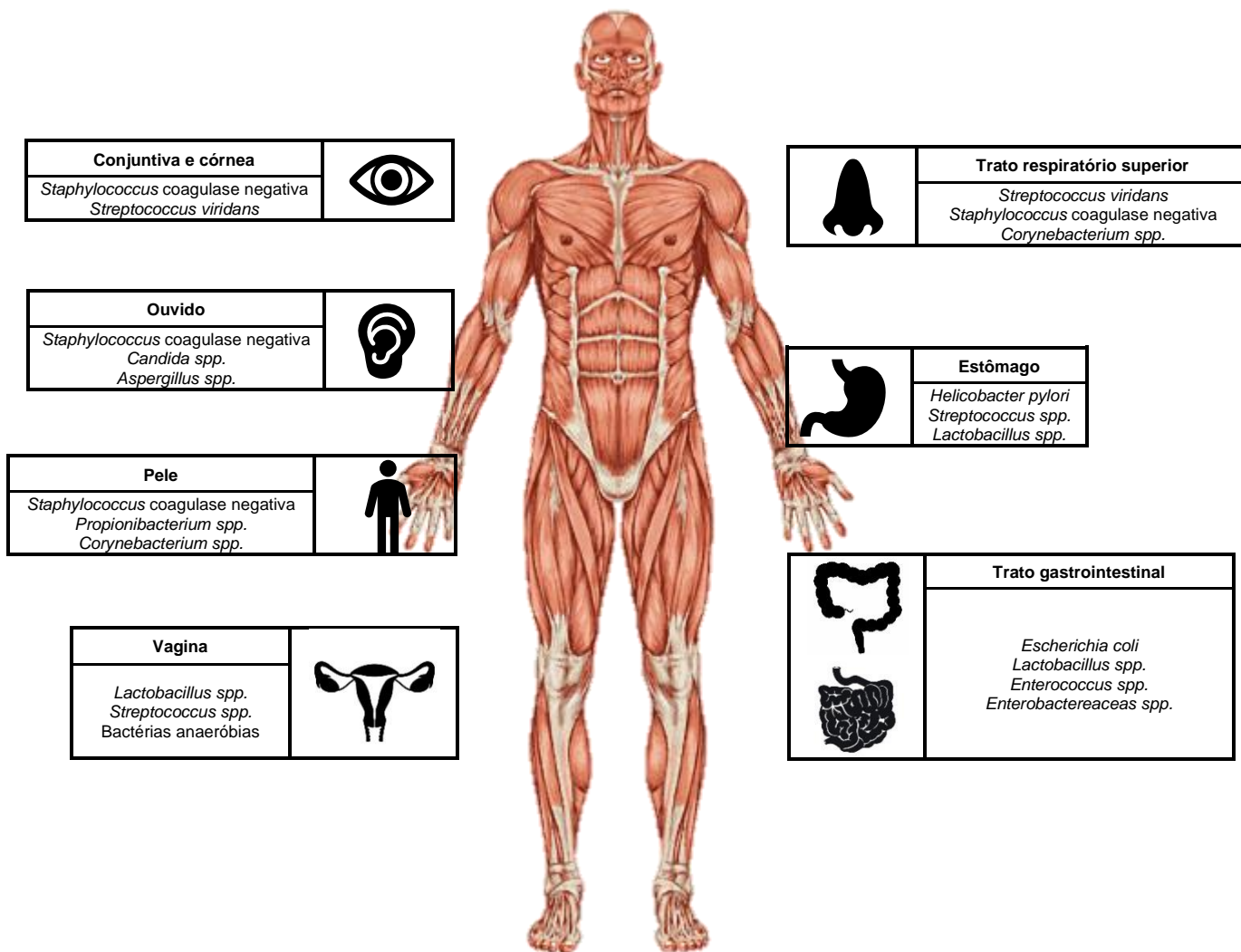


Figura 2.53 - Microbiota humano (Fonte: Schwebker, 1999; Prakash et al. 2011; Bassis et al 2015; Libório et al. 2005; Jenkinson et al. 2005).

No caso de uma perturbação da flora natural de um indivíduo, este poderá ficar mais suscetível à colonização por outros microrganismos exógenos, permitindo a proliferação de agentes oportunistas da flora e/ou microrganismos patogénicos, expondo-o a infeções. Assim, a capacidade do hospedeiro para reconhecer e responder aos invasores patogénicos enquanto simultaneamente tolera a flora residente é um dos feitos mais notáveis do organismo, sendo que esses mecanismos não são ainda completamente compreendidos (14,98–100).

O LMCBM rege-se de forma a tratar a população que serve, utilizando os critérios da Sociedade Espanhola de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica (SEIMC), a qual considera os microrganismos patogénicos apresentados no anexo 10, nas diferentes áreas da microbiologia (101).

Na figura abaixo encontram-se os principais microrganismos patogênicos, que se devem ter em valorização durante todo o procedimento laboratorial nos diferentes locais anatómicos.










<p><b>Conjuntiva e córnea</b></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Haemophilus influenzae</i>  <i>Neisseria meningitidis</i>  <i>Chlamydia trachomatis</i>  <i>Candida spp.</i>  <i>Acanthamoeba spp.</i>  Vírus Herpes Simplex  Adenovírus</p>	
<p><b>Ouvido</b></p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Aspergillus spp.</i>  <i>Candida spp.</i>  <i>Fusarium spp.</i></p>	
<p><b>Sangue</b></p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Klebsiella pneumoniae</i>  <i>Candida spp.</i>  <i>Cryptococcus neoformans</i>  <i>Histoplasma capsulatum</i>  <i>Plasmodium spp.</i>  <i>Leishmania spp.</i></p>	
<p><b>Trato respiratório inferior</b></p> <p><i>Candida spp.</i>  <i>Cryptococcus neoformans</i>  <i>Histoplasma capsulatum</i>  <i>Blastomyces dermatitidis</i>  <i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Blastomyces dermatitidis</i>  <i>Haemophilus influenzae</i>  Vírus Influenza  Vírus Parainfluenza  Coronavírus  Vírus Sincicial Respiratório  Adenovírus</p>	
	<p><b>Pele</b></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Streptococcus Grupo A</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  <i>Microsporum spp.</i>  Fungos <i>Dermatophytes</i>  <i>Cryptococcus neoformans</i>  Vírus Herpes Simplex  Vírus do Papiloma Humano  Vírus Varicela-Zoster</p>
	<p><b>LCR</b></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Candida spp.</i>  <i>Cryptococcus neoformans</i>  <i>Mycobacterium tuberculosis</i>  <i>Aspergillus spp.</i>  Vírus Herpes Simplex  HIV  <i>Streptococcus Grupo B</i>  <i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Neisseria meningitidis</i>  <i>Haemophilus influenzae</i>  <i>Staphylococcus aureus</i></p>
	<p><b>Trato respiratório superior</b></p> <p><i>Haemophilus influenzae</i>  <i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Candida spp.</i>  <i>Aspergillus spp.</i>  Coronavírus  Adenovírus  Vírus Influenza  Vírus Parainfluenza  Vírus Sincicial Respiratório</p>
	<p><b>Trato geniturinário</b></p> <p><i>Escherichia coli</i>  <i>Proteus spp.</i>  <i>Klebsiella spp.</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  <i>Enterococcus spp.</i>  <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>  <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1  <i>Candida albicans</i>  <i>Gardnerella vaginalis</i>  <i>Trichomonas vaginalis</i>  Vírus Herpes Simplex  Vírus do Papiloma Humano  HIV</p>
<p><b>Trato gastrointestinal</b></p> <p><i>Salmonella spp.</i>  <i>Shigella spp.</i>  <i>Campylobacter spp.</i>  <i>Clostridium difficile</i>  <i>Escherichia coli</i> 0157  Rotavírus  <i>Giardia lamblia</i>  <i>Candida spp.</i>  <i>Cryptococcus neoformans</i>  <i>Histoplasma capsulatum</i>  <i>Entamoeba histolytica</i>  <i>Ascaris lumbricoides</i></p>	

Figura 2.54 - Microrganismos considerados patogênicos (Fonte: Tille, 2017).

## 2.2.1 Produtos Biológicos

A colheita de produtos biológicos tem um papel fundamental no sucesso do resultado microbiológico. Assim, o modo de colheita, o *timing*, a assepsia e o transporte, contribuem para o sucesso do diagnóstico microbiológico (5).

No apêndice 7 podem ser observados todos os gráficos referentes aos principais microrganismos patogênicos em estudo e os testes de diagnóstico microbiológico nas amostras que se seguem.

#### 2.2.1.1 Urina

O trato urinário é colonizado por inúmeros microrganismos essenciais à saúde, contudo, em certas condições, podem, também, contribuir para o desenvolvimento de infecções do trato urinário. Estas são mais frequentes no sexo feminino devido à maior aproximação ao ânus, que contém bactérias da flora saprófita intestinal e devido ao menor comprimento da uretra. Em doentes internados os agentes etiológicos causadores de infecção são diversos (102,103).

#### 2.2.1.2 Exsudados

Exsudados são líquidos que são excretados através de paredes e membranas celulares, constituído por líquidos, células, fragmentos celulares e proteínas. A exsudação é uma etapa natural da cicatrização, funciona como fonte de energia para ativar o metabolismo celular e regular a humidade da região (102).

#### 2.2.1.3 Fezes

As fezes são constituídas maioritariamente por água, fibras, bactérias fecais, células intestinais e muco. O exame de fezes engloba análises macroscópicas e microscópicas, TAAN e testes imunocromatográficos, principalmente para pesquisa de bactérias patogênicas, parasitas (suspeita de parasitose) e vírus (102).

#### 2.2.1.4 Sangue e sangue medular

O sangue é uma substância fluida, formada por água, enzimas, proteínas, sais minerais e células, de forma a defender o organismo, transporte de gases e nutrientes (102).

A medula óssea é um tecido esponjoso, localizada na parte interna e central dos ossos, composto por células formadoras de sangue, células adiposas e tecidos de suporte (102).

As hemoculturas são utilizadas principalmente para diagnosticar bacteriemia ou fungemia, sendo que, a ponta de cateter deve vir junto, de modo a contabilizar os microrganismos que estão presentes em ambas as amostras (102).

### 2.2.1.5 Amostras respiratórias

Existem infecções do trato respiratório superior e inferior. Estas últimas podem provocar morbidade e mortalidade, sendo muito difíceis de diagnosticar visto que existe muita contaminação com secreções do aparelho respiratório superior durante a colheita (102). As pneumonias podem ser pneumonias adquiridas na comunidade (PAC) ou associadas aos cuidados de saúde ou pneumonias associadas aos cuidados de saúde (102).

### 2.2.1.6 Líquidos estéreis

Líquidos estéreis são aqueles provenientes de locais anatómicos estéreis como o canal raquidiano, biliar, abdominal, pericárdico, entre outros. Uma das infecções mais comuns e com manifestações clínicas graves, possivelmente mortal se não tratada precocemente, é a meningite bacteriana, constituindo uma emergência médica (102).

## 2.3 Bacteriologia

Ao longo dos anos, as bactérias têm evoluído na sua estrutura e funções, de forma a adaptarem-se às condições ambientais. Estas são procariontes e conseguem sobreviver em condições extremas (5).

As bactérias podem ser distinguidas de acordo com as suas características microscópicas, de crescimento, metabólicas, antigenicidade e genotípicas. Podem ser também utilizados testes de pesquisa de ácidos nucleicos e testes imunocromatográficos (5).

Através da microscopia é possível observar o tamanho, forma e a sua capacidade de reter ou não as colorações, diferenciando bactérias. Já através dos meios de cultura é possível diferenciar colónias de diferentes cores, tamanhos e formas, já que possuem nutrientes de acordo com as necessidades de crescimento

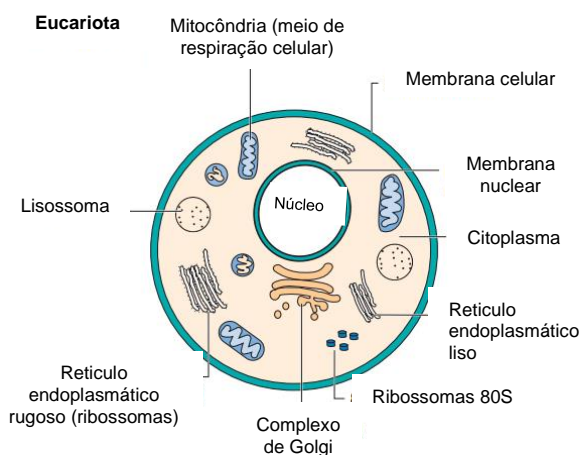
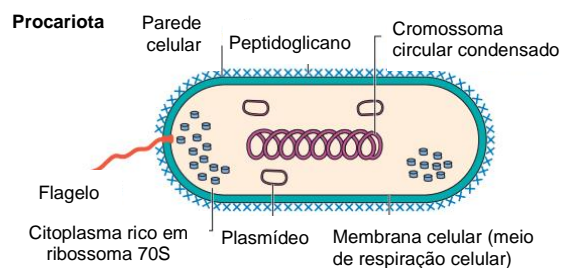


Figura 2.55 - Principais características dos procariontes e eucariontes (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).

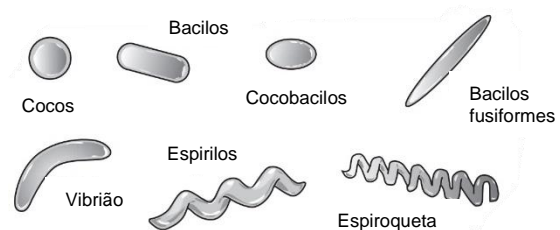


Figura 2.56 - Formas morfológicas das bactérias (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).

bacteriano. A capacidade de resistirem a certos antibióticos, fermentarem açúcares específicos e provocarem lise dos eritrócitos pode ser também utilizada na sua identificação (5,29).

O método mais preciso para classificar as bactérias é por análise do seu material genético. Uma vez que não requerem crescimento nem vida bacteriana, detetam rapidamente organismos de crescimento lento ou bactérias muito virulentas, identificando a família e/ou género e as sequências que distinguem uma espécie ou subespécies através do DNA ribossómico (5).

Podem ser observadas algumas características das bactérias mais comuns clinicamente no Apêndice 3.

### 2.3.1 O Papel das Bactérias nas Doenças

O desenvolvimento de uma infeção depende da suscetibilidade do hospedeiro à mesma, à virulência do organismo e a oportunidade de interação entre o hospedeiro e o microrganismo (5).

Perante uma infeção, deve ser avaliada a história clínica que aponta para um conjunto de microrganismos mais prováveis de estarem associados ao processo infeccioso. A etiologia de algumas doenças pode ser atribuída a um ou vários microrganismos (5).

### 2.3.2 Diagnóstico Laboratorial de Doenças Bacterianas

O diagnóstico de infeções bacterianas, é realizado através da pesquisa do agente por técnicas microscópicas, por exame cultural, provas bioquímicas, por pesquisa de antígenos específicos, entre outros, utilizando técnicas manuais e sistemas automatizados. Após identificação, se for valorizável em contexto clínico, na maioria das vezes é possível efetuar o antibiograma, com objetivo de fornecer informações para a escolha terapêutica (16,31,104,105).

Para o exame cultural é necessário a manutenção da viabilidade da bactéria, pelo que é de grande importância que a colheita seja feita corretamente (antes da antibioterapia se possível), entregue rapidamente ao laboratório em condições adequadas, maximizando a deteção de microrganismos responsáveis pela infeção. A sensibilidade desta metodologia é de elevada importância, contudo o tempo de resposta é, geralmente igual ou superior a 48 horas (5).

Abaixo pode-se observar a classificação de algumas bactérias de interesse clínico.

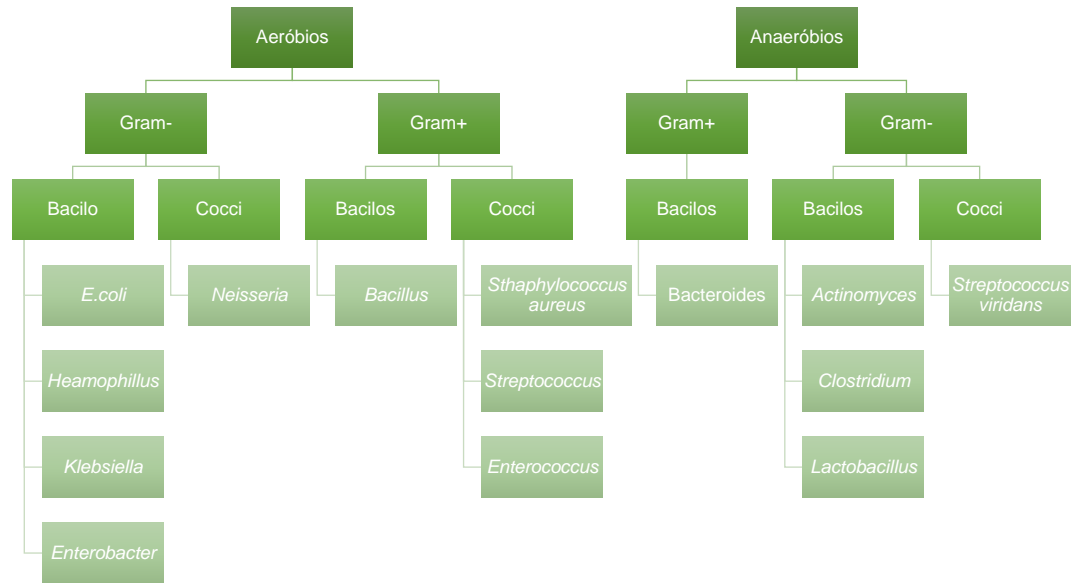


Figura 2.57 - Classificação das bactérias patogénicas (Fonte: adaptado de Barroso et al., 2014).

### 2.3.2.1 Valorização

Após incubação, é realizada uma análise morfológica das colónias de microrganismos, valorizando-se as comumente observadas nas infeções dos diferentes locais anatómicos. É nesta fase que são determinados os testes e procedimentos para identificação, caracterização e possível TSA dos microrganismos de interesse. Durante a identificação e TSA poderá ser necessário proceder ao reisolamento do microrganismo para outro(s) meio(s) de cultura, visto que, muitas das vezes são encontradas culturas mistas, impossibilitando a seleção precisa do microrganismo em estudo (12,13,45).

Os resultados são dados através da contagem de colónias existentes, de forma a determinar as unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro (mL).

A título de exemplos:

- No caso das amostras de urina, o fator de correção de litro (L) para mL é de  $10^3$ , quando utilizada uma ansa de 1 microlitro ( $\mu\text{L}$ ). Já o fator de correção de L para mL é de  $10^2$ , quando utilizada uma ansa de 10  $\mu\text{L}$ . Na seguinte tabela pode ser observada a valorização das colónias nas placas de Petri de amostras de urina.

Tabela 2.3 - Valorização das amostras de urina (Fonte: Direção-Geral de Saúde, 2012; Hooton T, Bradley S, Cardenas D et al., 2010).

Tipos de colónias	Contagem	UFC/mL (ansa 1 µL)	Não invasivos (ansa 1 µL)	Invasivos (ansa 10 µL)	UFC/mL (ansa 10 µL)
1	>100	>10 <sup>5</sup>	Sim	Sim	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>
	10 – 100	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	Sim	Sim	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>
	1 – 10	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	Se leucocitúria: Bacilos Gram- grupo I e II e <i>S. saprophyticus</i>	Bacilos Gram- grupo I e II	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>
2	>100	>10 <sup>5</sup>	Grupo I e II	Sim	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>
	10 – 100	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	Se leucocitúria: Bacilos Gram- grupo I e II	Sim	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>
	1 – 10	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	Não	Não	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>
3			Só valorizar se houver predomínio fraco (>10 <sup>3</sup> ) de tipo 1 do grupo I	Não	

- No caso das amostras respiratórias valoriza-se, macroscopicamente, o crescimento microbiano em meio de GS, MAC e/ou HAE a partir do 3º quadrante. Em termos microscópicos, na coloração de Gram, detetam-se as células epiteliais da orofaringe, as quais deverão ser inferiores a 10 células por campo numa observação a 1000x e as células polimorfonucleares, as quais deverão ser superiores a 10 células por campo numa observação a 1000x, isto, para ser considerada uma boa amostra sem contaminações relevantes. Já na coloração de Ziehl-Neelsen, detetam-se as bactérias ácido-resistentes para rastreio da doença tuberculose, já que esta constitui um problema de saúde pública, confirmando-se pela observação de bacilos corados de vermelho (29).

### 2.3.3 Micobacteriologia

As micobactérias são consideradas bactérias em forma de bacilo, ácido-resistentes, Gram+, aeróbias, de crescimento lento (organismos fastidiosos), com parede celular rica em lípidos, incluindo o ácido micólico que lhes conferem as suas características e resistência perante condições adversas (5,17,29).

A micobacteriologia aplica novas tecnologias nomeadamente sistemas semi-automatizados de incubação com monitorização contínua e deteção do crescimento em meio líquido, permitindo uma maior sensibilidade e rapidez quando comparados com os meios tradicionais de isolamento de micobactérias (5).

O diagnóstico é feito por microscopia, cultura *in vitro* demorada por serem microrganismos fastidiosos, mais recentemente, TAAN que permitem realizar a identificação e detetar algumas resistências a antimicrobianos. (5).

## 2.4 Micologia

Cada vez mais os fungos são causadores de infecções consideradas graves, em doentes imunodeprimidos como transplantados, com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e em doentes oncológicos, entre outras doenças que poderão afetar o sistema imunitário ou pela toma de determinados tipos de medicação, logo, é necessário atuar de forma rápida e eficiente através do diagnóstico laboratorial (5).

Os fungos são organismos eucariotas, podendo ser unicelulares, onde se encontram as leveduras, que formam colónias redondas pastosas e/ou baças, ou podem ser pluricelulares, onde se encontram os fungos filamentosos, constituídos por hifas multinucleares ou divididas por partições, ou seja, cenocíticas ou septadas, respetivamente. São estas que formam o micélio. Contudo, existem fungos dimórficos que podem existir tanto em forma de levedura como de fungo filamentoso (5,45).

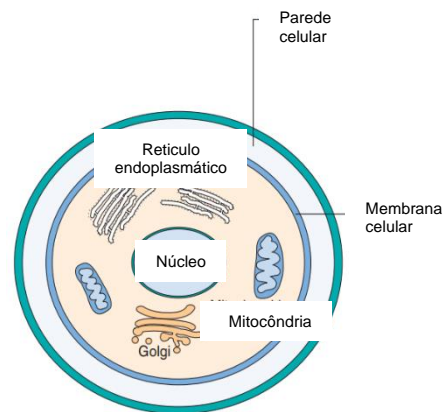


Figura 2.58 - Principais características dos fungos (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).

Os seus constituintes podem ser observados na figura ao lado.

Os fungos podem ser divididos em:

- Saprófitas, organismos que vivem em matéria morta ou em decomposição;
- Simbiontes, organismos que vivem juntos e a sua associação leva a benefícios mútuos;
- Comensais, organismos que vivem em relação estreita onde um é beneficiado e o outro não é beneficiado nem prejudicado;
- Parasitas/opportunistas, organismos que vivem num hospedeiro onde consegue obter benefícios, prejudicando o hospedeiro em caso de patógenos (5).

A reprodução dos fungos dá-se através da formação de esporos que podem ser sexuais (meiose) ou assexuais (mitose) (5).

Na figura ao lado pode-se observar a classificação dos fungos com interesse clínico.

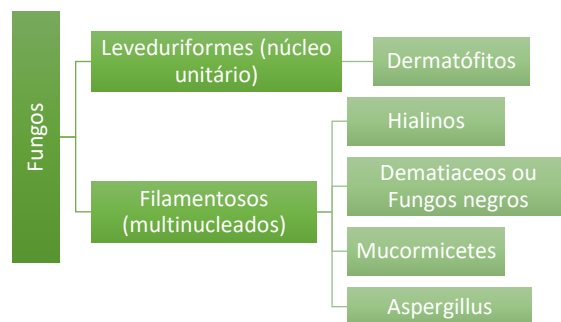


Figura 2.59 - Classificação dos fungos patogénicos (Fonte: Tille, 2017).

No apêndice 4 encontram-se as características macroscópicas e microscópicas de alguns fungos patogênicos mais relevantes.

### 2.4.1 O Papel dos Fungos nas Doenças

Por norma, indivíduos imunocompetentes e saudáveis têm uma elevada resistência a infecções fúngicas, mesmo em contacto permanente com vários fungos presentes na flora comensal (endógenos) e no ambiente (exógenos). Porém, existem fungos com virulência suficiente para serem considerados patógenos primários devido à sua capacidade de conseguir iniciar infecção num hospedeiro aparentemente imunocompetente, colonizando-o e multiplicando-se em ambientes com substratos nutricionais suficientes, evitando os mecanismos de defesa do hospedeiro (5,29).

Os fungos patogênicos têm uma fase saprófita caracterizada por hifas septadas filamentosas, produzindo células infecciosas transmitidas pelo ar. Na fase parasitária, ocorre a reprodução assexuada no sistema respiratório do hospedeiro (5).

As infecções por fungos diferem de acordo com o agente, sendo necessário um diagnóstico diferencial que deve considerar o estado imunológico do hospedeiro, a interação entre o hospedeiro e o fungo e os agentes fungicidas mais propensos de causar uma da doença endêmica (5).

### 2.4.2 Diagnóstico Laboratorial de Doenças Fúngicas

O diagnóstico de infecções fúngicas depende da microscopia e exame cultural. A informação clínica do indivíduo juntamente com a origem da amostra biológica, auxilia na indicação do fungo mais provável de ser causador de determinado tipo de infecção (5).

Algumas das doenças fúngicas mais comuns são as infecções nas unhas, candidíase vaginal, da orofaringe e do esófago. No LMCBM são mais frequentemente analisadas amostras de hemoculturas/mieloculturas, LCR, cabelos, unhas, pele, biopsias, exsudados, entre outras, para diagnóstico microbiológico.

No LMCBM são utilizados os métodos microbiológicos convencionais como o exame direto por microscopia, exame cultural (observação macroscópica frente e verso), a identificação em sistema MALDI-TOF pela extração de um espectro de proteínas das células fúngicas e o teste de suscetibilidade a antifúngicos, e ainda utilizando os TAAN. As bases de dados para identificação de alguns tipos de fungos no VITEK MS Prime ainda não são muito robustas, assim, é indispensável a observação microscópica e macroscópica para identificação dos fungos. O exame direto por microscopia é considerado o método mais equilibrado em termos de custo-benefício de diagnóstico de infecções fúngicas, permitindo a deteção e identificação pela observação das

características morfológicas. O exame cultural é considerado o método mais sensível pois permite isolar os fungos e identificá-los, possibilitando ainda, a testagem contra antifúngicos. São utilizados meios de cultura:

- Não seletivos: Crescimento rápido de leveduras e fungos filamentosos e crescimento mais lento de fungos fastidiosos, como meio Sabouraud simples;
- Seletivos: Habitualmente é utilizado o meio Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol, que isola fungos devido à presença de gentamicina e cloranfenicol que inibem o crescimento da maioria das bactérias e contém nutrientes devido às peptonas e glucose presentes no meio;
- Cromogêneos: CHROMID® *Candida* spp. é um exemplo de meio que permite isolar e identificar presuntivamente várias espécies de *Candida* através da cor das colônias apresentada no meio de cultura. As suas especificidades podem ser observadas no apêndice 1 (5,29,45).

Quando há crescimento de fungos em meio de cultura, os fungos produzem hifas vegetativas que crescem sob e/ou abaixo do meio. As hifas aéreas constituem um meio de disseminação do fungo através de elementos reprodutivos assexuados designados por conídios, sendo estas estruturas essenciais para a caracterização dos fungos com base na microscopia (5,45).

## 2.5 Parasitologia

Parasitas são seres vivos que retiram recursos de outros organismos para a sua própria sobrevivência. Estes podem viver por vários anos num hospedeiro sem causar danos graves nem prejudicar funções vitais, no entanto, algumas parasitoses podem ser fatais. São transmitidos, principalmente, por via fecal-oral a partir de alimentos e águas contaminadas (5,29).

Existem vários fatores diferenciais entre países que podem influenciar a prevalência de parasitoses, como as condições de saneamento básico, o clima e o meio ambiente, os padrões de migração, a educação e as políticas de saúde pública, assim, existirá uma maior prevalência de certos parasitas em certos locais do globo, designados de locais endêmicos (5).

Os parasitas podem ser divididos em dois grandes grupos: protozoários que são unicelulares, com um tamanho médio entre 2-100µm, e em metazoários que são organismos multicelulares alongados e bilateralmente simétricos, com tamanhos que podem ir de 1 mm a 1 m ou mais e frequentemente têm estruturas de fixação que podem ser úteis na identificação do organismo. Abaixo podem ser observados as classificações dos diferentes tipos de parasitas (5,29).

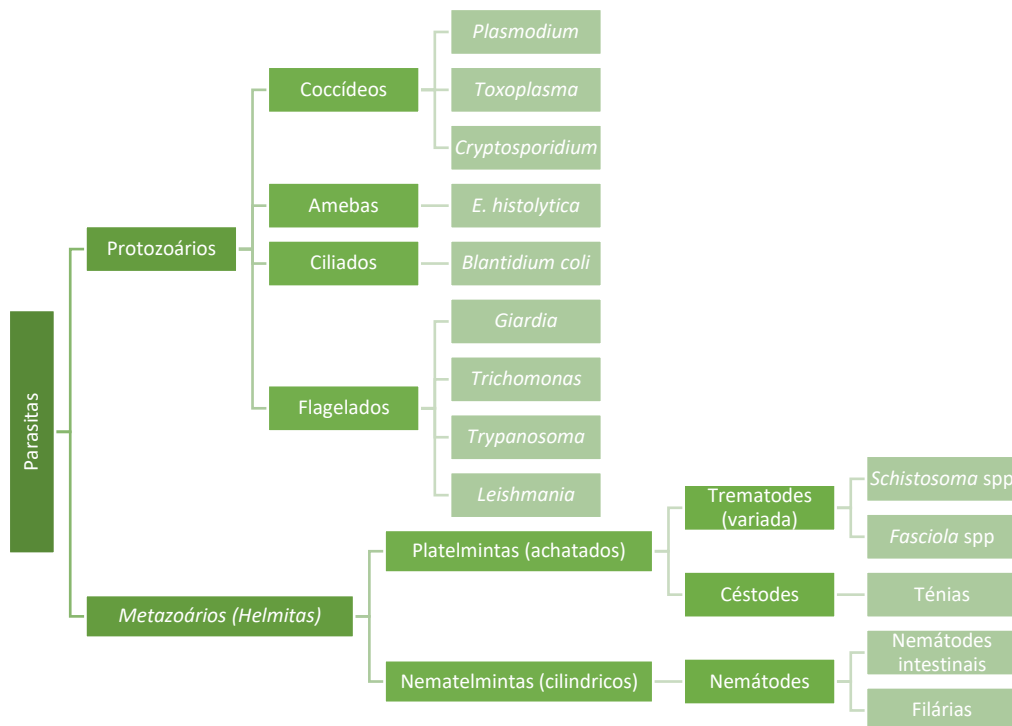


Figura 2.60 - Grupos de parasitas mais comuns no laboratório (Fonte: W. Peter, H.M. Gilles, 1981).

Os parasitas podem ter ciclos de vida complexos, envolvendo um único hospedeiro ou múltiplos, sendo através deste ciclo de vida que é compreendida a distribuição geográfica, transmissão e patogenicidade das doenças parasitárias, sendo útil na determinação do diagnóstico parasitário(29).

As características morfológicas, reprodutivas e organelos de locomoção estão presentes no Apêndice 5.

### 2.5.1 O Papel dos Parasitas nas Doenças

Os parasitas são exclusivamente de fonte exógena. A transmissão ocorre pela contaminação alimentar e ambiental de dejetos de humanos e animais infetados (5,29). É relevante salientar que indivíduos com SIDA, quando em contacto com parasitas, estão mais suscetíveis a parasitoses, pois a contagem de células CD4 encontram-se inferiores a  $200\text{mm}^3$ , apresentando imunidades muito baixas (5).

O ciclo de vida do parasita depende de cada espécie e dos tropismos teciduais, que determinam os órgãos ou tecidos do hospedeiro no qual o parasita pode sobreviver. Portanto, os fatores associados à patogenicidade do parasita são mediados pela exposição, invasão por penetração das barreiras anatómicas, ligação, inativação das defesas do hospedeiro, replicação e dano das células e tecidos (5,45).

Na determinação da possibilidade da existência de uma parasitose, deve-se ter com conta diversos fatores na história clínica do doente, nomeadamente viagens recentes, nacionalidade, idade, uso de profilaxias e o estado imunológico do hospedeiro (5).

Uma parasitose pode ser muito diferente entre um viajante imunodeprimido a uma região endêmica e um residente com boas capacidades imunológicas da mesma região, o que leva a que as estratégias de tratamento e prevenção sejam distintas (5).

## 2.5.2 Diagnóstico Laboratorial de Doenças Parasitárias

A deteção e identificação de parasitas é conseguida no LMGBM por deteção microscópica para identificação morfológica, por TIC ou TAAN em casos de pouca quantidade, permitindo a deteção e identificação de parasitas (5).

Os eosinófilos são células do sistema imunológico, responsáveis pela ação contra parasitas multicelulares. Logo, se o número de eosinófilos estiver elevado em relação a outras células do sangue, pode ser indicativo de doença parasitária.

Os sintomas clínicos podem aparecer ainda antes de existirem formas parasitárias que possam ser detetadas. Assim, devido aos ciclos de vida complexos dos parasitas, apenas ao fim de 3 análises a diferentes amostras, é confirmado o diagnóstico, para a presença ou ausência de parasitas no organismo (5,20).

As amostras de sangue devem ser imediatamente analisadas assim que chegam ao laboratório para pesquisa, normalmente de *Plasmodium spp.* ou *Leishmania spp.* (no LMGBM) por coloração de Giemsa como indicado no capítulo 2.1.1.4.1. (5).

No caso das amostras de fezes, devem ser colhidas 3 amostras em dias alternados, 2 amostras em frascos secos e uma amostra em frasco com meio de conservação. Devem ser analisadas o mais rapidamente possível assim que chegam ao laboratório ou conservadas a 4°C em formol (20).

A análise de fezes inicia-se com uma avaliação macroscópica, já que a consistência das amostras fecais está relacionada com o tipo de parasita presente, depois é realizada a observação microscópica. São utilizadas, neste contexto, o exame direto, o exame após concentração e o exame após coloração como indicado no capítulo 2.1.1.4.1. (5,20,29).

## 2.6 Virologia

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que dependem da célula hospedeira para a sua replicação, uma vez que não conseguem produzir energia, reproduzir as suas proteínas, nem o seu genoma independentemente da célula hospedeira (5).

As estruturas físicas e genéticas dos vírus foram alteradas por mutação e seleção para infetar humanos e outros hospedeiros. Para este efeito, possuem a capacidade de

atravessar barreiras protetoras, aderindo-se à célula hospedeira para replicação, evadindo-se a resposta imune do hospedeiro (5).

A característica estrutural e genética do vírus fornece informações sobre a sua replicação, transmissão e causa de doenças (5).

O genoma viral pode ser constituído por DNA (cadeia simples ou dupla, linear ou circular) ou RNA (cadeia simples ou duplas, ou segmentado em pedaços, cada pedaço codificando 1 ou mais genes). O genoma organiza-se dentro de uma cápsula protetora constituída por proteínas e, para alguns vírus, uma membrana. Quanto maior for o genoma, mais complexo o vírus será (5,29).

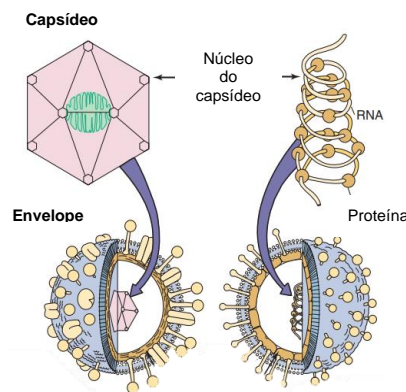


Figura 2.61 - Principais características dos vírus (Fonte: Murray, Rosenthal, Pfaller, 2016).

A parte exterior do vírus pode possuir uma capsídeo, capaz de suportar condições ambientais adversas, ou um envelope, uma membrana constituída por lípidos, proteínas e glicoproteínas que não resiste a secagens, ácidos e detergentes para inativação do vírus, protegendo-os e mediando a interação do vírus com a célula-alvo através da proteína de ligação viral. A remoção da camada externa inativa o vírus, assim, anticorpos gerados contra a proteína de ligação viral previnem a infeção (5,29).

Numa primeira fase de infeção, o vírus reconhece a célula-alvo, é absorvido pela célula e liga-se à mesma penetrando a membrana plasmática, libertando o seu genoma no citoplasma. Numa fase tardia, através da maquinaria celular, que lhe fornece energia e o necessário para a síntese de proteínas virais e replicação do genoma, são obtidas cópias idênticas de si mesmo, libertando-se da célula (5).

### 2.6.1 O Papel dos Vírus nas Doenças

A epidemiologia viral depende de vários fatores como das características do vírus, o modo de transmissão, a suscetibilidade da população e as intervenções de saúde pública (5).

A maioria das infeções virais causa sintomas leves ou assintomáticos e não requer tratamento. A doença decorre da propagação do vírus nos tecidos, podendo causar dano e/ou morte celular devido à replicação do vírus (5).

Os sintomas e gravidade destas infeções são determinados pela capacidade do paciente para travar a propagação ou resolver rapidamente a infeção antes que o vírus atinja os órgãos importantes ou cause danos significativos. Assim, a imunização por infeção prévia ou vacinação é o melhor meio de proteção contra doenças virais, pois resultam na ativação do sistema imunitário, levando à produção de anticorpos

específicos, eliminando ou inativando o vírus. Desta forma, é possível prevenir a propagação viral (5).

## 2.6.2 Diagnóstico Laboratorial de Doenças Virais

O diagnóstico viral sempre enfrentou desafios laboratoriais, pois ao contrário das bactérias, estes não crescem em meios de cultura correntemente utilizados em microbiologia e as estruturas não são possíveis de ser observadas em microscopia convencional. São necessários microscópios especiais, que apenas se encontram distribuídos em alguns laboratórios. Portanto, têm sido utilizados TAAN, visto que são técnicas rápidas e eficazes na detecção de agentes virais, mesmo na presença de vírus latentes. Estes testes, vieram colmatar algumas limitações nas resistências virais, de modo a direcionar o tratamento da doença e monitorar a doença epidemiologicamente, bem como educar médicos e utentes (5,45).

No LMCBM são utilizados métodos de detecção de material genético para a doença viral. Os métodos para detetar a presença viral utilizam sondas de sequências específicas marcadas por fluorocromos, sendo a PCR, a mais utilizada neste laboratório. Estas sondas são complementares a alvos genéticos específicos do vírus a identificar, permitindo detetá-lo mesmo estando inativo. A análise da sonda é útil para detetar vírus de replicação lenta ou improdutivos como o vírus do papiloma humano ou quando não é possível utilizar testes imunológicos. A técnica de PCR em tempo real permite quantificar a carga viral para tratamento (por exemplo de HIV) (5,45).

### 3 Considerações finais

O diagnóstico microbiológico é fundamental para conduzir e monitorizar tratamentos, para a vigilância epidemiológica, para fins educacionais e para a implementação de políticas de saúde. O sucesso deste depende de vários fatores como dos materiais e equipamentos utilizados, colheita e transporte apropriados, técnicos com formação para a população que servem, estrutura laboratorial e capacidade de interpretação de resultados. Independentemente das limitações, deve sempre trabalhar dentro de um sistema de qualidade para o sucesso dos resultados.

Durante o estágio no LMCBM foi possível refletir sobre as capacidades desenvolvidas de forma contínua e sobre as competências adquiridas, permitindo o desenvolvimento de sentido de organização, responsabilidade e de trabalho de equipa, mas principalmente, uma consciencialização das funções praticadas, tal como a compreensão da responsabilidade do diagnóstico microbiológico na sociedade e a importância do cumprimento de boas práticas ao longo das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

O relatório foi executado de forma a tentar expor os conhecimentos adquiridos durante o período de tempo em que decorreu o estágio profissional. Assim, foram referidos todos os detalhes relevantes na deteção, isolamento, identificação e na determinação da suscetibilidade a antimicrobianos para um diagnóstico correto no menor tempo possível. O agente patogénico de uma infeção é detetado, isolado, identificado e caracterizado através de várias técnicas como por cultura de microrganismos, TIC, testes imunofluorescentes, TAAN, microscopia, entre outros. Muitos destes métodos utilizam equipamentos automatizados que facilitam, agilizam e auxiliam todo o processo laboratorial, oferecendo várias vantagens como maior eficiência, redução de erros, respostas mais rápidas e maior capacidade de processamento de amostras, mas também algumas desvantagens como custos elevados, dependência de energia e infraestruturas com especificações particulares. Por último, é testado por exposição a diferentes agentes antimicrobianos para avaliar a sua eficácia, determinando se o microrganismo é suscetível ou resistente ao medicamento aplicado. Assim, estes dados laboratoriais podem constituir um auxílio importante para os clínicos em particular na seleção do tratamento mais adequado para certa infeção no contexto do doente.

As técnicas moleculares têm dado um grande contributo ao diagnóstico microbiológico, pois permitem obter respostas mais rápidas e rigorosas, identificando microrganismos através da amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* e sondas moleculares.

Pretende-se que todos os exames laboratoriais devam ser definidos de acordo com a população que o laboratório serve. Por esse mesmo motivo não existem métodos

definitivos, procurando-se constantemente métodos mais sensíveis, rápidos, seguros e baratos, que acompanhem as necessidades para os principais problemas emergentes. O laboratório tem um importante papel na prestação de cuidados de saúde ao indivíduo em particular, recebendo acesso à terapêutica direcionada, mas também à população em geral, pois o conjunto de análises microbiológicas dos resultados ao longo de determinado tempo, permitem perceber as resistências e prevalências de certa doença, determinando as políticas em saúde e a necessidade ou não da existência de campanhas de informação. Utilizando como exemplo a pandemia derivada ao SARS-COV-2 (COVID-19), foi necessário para controlo da infeção diagnosticar e isolar a população infetada de forma a controlar a disseminação viral.

Atualmente, existe um problema grave quanto à toma desadequada de antimicrobianos. A toma indevida, elimina todos os microrganismos sensíveis da flora pela pressão seletiva, porém, fornece resistência aos microrganismos que não são eliminados, os quais são posteriormente libertados para o meio ambiente. Assim, o laboratório é essencial neste direcionamento, de forma a evitar os avanços nas resistências microbianas.

Após a realização do presente relatório, concluiu-se que vários fatores influenciam os resultados microbiológicos, contudo, com o avanço tecnológico cada vez mais é possível diagnosticar eficazmente doenças infecciosas, reduzindo a morbidade e mortalidade, contribuindo para a melhoria do bem-estar geral da população.

## 4 Referências bibliográficas

1. Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO) [Internet]. Disponível em: <http://www.chlo.min-saude.pt/>
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar. 1ª. Ministério da Saúde. 2000. 56 p.
3. ISO 2005. TECHNICAL REPORT ISO/TR 22869. Medical laboratories — Guidance on laboratory implementation of ISO 15189:2003. 2011;
4. RA M, MR P. Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods. 23.ª ed. ELSEVIER, editor. 2017.
5. Murray, Rosenthal, Pfaller. Medical Microbiology. 8ª. 2016.
6. World Health Organization. LABORATORY BIOSAFETY MANUAL FOURTH EDITION [Internet]. 2021 [citado 10 de Dezembro de 2023]. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/337956/9789240011311-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. Labgard Class II, Type A/B3 Laminar Flow Biological Safety Cabinet Models NU-425-300/400/600 Bench/Console Operation & Maintenance Manual (Series 2X) (NU-425-400/600 Only). 1999.
8. NuAire. BIOSAFETY CABINET TYPES [Internet]. [citado 22 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.nuaire.com/resources/biosafety-cabinet-types-article>
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. manual\_microbiologia\_completo.
10. UK NEQAS. UKNEQAS-Microbiologia [Internet]. Disponível em: [www.ukneqasmicro.org.uk](http://www.ukneqasmicro.org.uk),
11. BAREFANGER J, DRAKE C, KACICH G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37(5):1415–8.
12. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) - Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI). Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia. 2004;
13. Tille P. Diagnostic Microbiology. 13, editor. 2014.
14. Helena Barroso, A. Meliço-Silvestre, Nuno Taveira. MICROBIOLOGIA MÉDICA. LIDEL, editor. 2014.
15. microbiologia.comunidades. EXAME A FRESCO [Internet]. [citado 11 de Julho de 2023]. Disponível em: [http://www.microbiologia.comunidades.net/exame-a-fresco#\\_ftn1](http://www.microbiologia.comunidades.net/exame-a-fresco#_ftn1)
16. Biomérieux [Internet]. Disponível em: <http://www.biomerieux.com/>

17. W. Peter, H.M. Gilles. A Colour Atlas Of Tropical Medicine And Parasitology. 1981;
18. Stainer S. AEROSPRAY® GRAM MODEL 7322 Applications Manual.
19. Biomérieux. RAL STAINER.
20. Shore Garcia L. 6TH EDITION DIAGNOSTIC MEDICAL PARASITOLOGY.
21. William dos Santos Damasceno. Roteiro Do Método de Willis [Internet]. [citado 30 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/590603823/Roteiro-do-metodo-de-Willis>
22. Kayser M. EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES.
23. Profa. Dra. Irene Soares. Diagnóstico laboratorial das infecções parasitárias do trato gastrointestinal.
24. Inês<sup>1</sup> EDJ, Cristina M, Teixeira<sup>1</sup> A, Maria N, Neves<sup>2</sup> A, Matos Soares<sup>1</sup> N. Optimizing the recovery of infective larvae of *S. Stercoralis* to obtain antigen. med biol. 2010;(11):149–53.
25. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde B. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet]. 2009. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>
26. Terry Leonard Nelson, Mendoza Hernández Carlos. Importância do estudo do esfregaço de sangue periférico em idosos. Vol. 3. 2017. 362–382 p.
27. Rigo CR, Maura Franco RB, Maura Bueno Franco R. Comparação entre os métodos de Ziehl-Neelsen modificado e Acid-Fast-Trichrome para a pesquisa fecal de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*. Vol. 35, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2002.
28. Vinícius Bolzan. Microscopia de fungos filamentosos. 2023.
29. Patricia M. Tille. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 14.<sup>a</sup> ed. Elsevier Health Sciences.; 2017.
30. Patrick R. Murray, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, H. Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8.<sup>a</sup> ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 2003.
31. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 5.<sup>a</sup> ed. Saunders, editor. 2015.
32. Thermo Scientific. CampyGen™ Compact Sachet.
33. Thermo Scientific. AnaeroGen™.
34. OXOID. Indicador Anaeróbico.
35. Prof. Acácio Rodrigues. Aspectos gerais das infecções por bactérias anaeróbias. Diagnóstico laboratorial das infecções por bactérias anaeróbias.

36. TodasAsRespostas. Quais os antibióticos aminoglicosídeos? [Internet]. [citado 18 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://todasasrespostas.pt/quais-os-antibioticos-aminoglicosideos>
37. Biomérieux. BACT/ALERT® VIRTUO® [Internet]. [citado 17 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.bing.com/search?q=BACT%2FALERT%2FVIRTUO%2F&cvid=bd0aa961461e43ccbe05420502f76f2e&aqs=edge..69i57j69i58j69i61.202j0j4&FORM=ANAB01&PC=LCTS>
38. Biomérieux. BACT/ALERT® PF Plus.
39. Biomérieux. BACT/ALERT FN Plus.
40. Biomérieux. BACT/ALERT® FA Plus.
41. Biomérieux. Manual do Utilizador do Sistema de Detecção Microbiana [Internet]. 2014. Disponível em: [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)
42. Becton Dickinson. Meios, Tecnologia de Fluorescência e Algoritmos.
43. Becton Dickinson. BD BACTEC™ Myco/F Lytic Medium. 2007.
44. Becton Dickinson. BACTEC MGIT.
45. Leber AL. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ª. Vols. 1–3.
46. Becton Dickinson. BD BACTEC™ MGIT™ 960 e 320 [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/microbiology-testing/bactec-mgit-960-and-320>
47. Sperber WH, Tatini SR. Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of Staphylococcus aureus. Vol. 29, APPLIED MICROBIOLOGY. 1975.
48. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 5 de Agosto de 2015;6:791.
49. Biomérieux. VITEK® MS PRIME [Internet]. [citado 17 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-ms-prime>
50. Pincus DH. Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. *Encycl Rapid Microbiol Methods*. 2006.
51. Biomérieux. VITEK 2 GN.
52. Fonseca A, Sebastião C, Martins F, Ribeiro M, Calheiros I, Lito LM, et al. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde, Dr Ricardo Jorge. 2004;
53. Biomérieux. VITEK 2 AST-P648.
54. Bruker Daltonics GmbH & Co. KG. MIC-Strip Colistin. Em: Instructions for Use. 2021.
55. Daltonics B. brochure UMIC Product Line.
56. Biomérieux. Mycoplasma IST 2. 2012;1.

57. Fernando Ferreira FERREIRA L, Lemos GONZAGA L, de Almeida Lanzi P, Elisabeth Peres R. Relação Antígeno-Anticorpo.
58. Coris BioConcept. Imunocromatografia. [citado 18 de Janeiro de 2023]. Nossa tecnologia. Disponível em: <https://www.corisbio.com/technology#chromatography>
59. BIO-RAD. MONOFLUO Legionella pneumophila IFA Test Kit . 32514. 2012;56–66.
60. BIO-RAD. PCR (Polymerase Chain Reaction) [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/pcr-polymerase-chain-reaction?ID=LUSNYI15>
61. BIO-RAD. What is Real-Time PCR (qPCR)? [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
62. OMEGA. Overview of PCR and RT-PCR [Internet]. [citado 18 de Maio de 2023]. Disponível em: [https://www.omegafilters.com/life\\_science/PCR\\_and\\_RT-PCR\\_overview](https://www.omegafilters.com/life_science/PCR_and_RT-PCR_overview)
63. Biomadam. Types of PCR – Common Kinds of Polymerase Chain Reaction [Internet]. [citado 18 de Maio de 2023]. Disponível em: [https://www.biomadam.com/types-of-pcr?utm\\_content=cmp-true](https://www.biomadam.com/types-of-pcr?utm_content=cmp-true)
64. Cepheid. Assistência Global da Cepheid.
65. Cepheid. GeneXpert [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://cepheid.widen.net/view/pdf/m3nobf8hlz/Cepheid-GeneXpert-System-Menu-Flyer-CE-IVD-0293-Portuguese.pdf?t.download=true&u=escyfu>
66. GmbH Q. BioRobot® EZ1 DSP Workstation User Manual. 2007.
67. QIAGEN. EZ1 DNA Handbook. 2004.
68. Seegene. Seegene STARlet [Internet]. [citado 11 de Julho de 2023]. Disponível em: [https://www.seegene.com/instruments/seegene\\_starlet](https://www.seegene.com/instruments/seegene_starlet)
69. Seegene. Allplex™ Gastrointestinal Panel Assays [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: [https://www.seegene.com/assays/allplex\\_gastrointestinal\\_panel\\_assays](https://www.seegene.com/assays/allplex_gastrointestinal_panel_assays)
70. Seegene. Allplex™ Genital ulcer Assay [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: [https://www.seegene.com/assays/allplex\\_genital\\_ulcer\\_assay](https://www.seegene.com/assays/allplex_genital_ulcer_assay)
71. Seegene. Anyplex™ II HPV HR Detection [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: [https://www.seegene.com/assays/anyplex2\\_hpv\\_hr\\_detection](https://www.seegene.com/assays/anyplex2_hpv_hr_detection)
72. BIO-RAD. CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system?ID=LJB1YU15>
73. Real-Time PCR CFX96 Touch Real-Time PCR System.

74. HOLOGIC. PANTHER FUSION® (Hologic®) [Internet]. [citado 11 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://www.hologic.com/hologic-products/diagnostic-solutions/panther-fusion-system>
75. Hologic. SARS-CoV-2/Flu A/B/RSV Assay (Panther Fusion™ System).
76. Hologic. Flu A/B/RSV Assay (Panther Fusion® System).
77. Hologic, Inc. Paraflu Assay (Panther Fusion® System) Panther Fusion® Paraflu.
78. Hologic. SARS-CoV-2 Assay (Panther Fusion® System) Panther Fusion® SARS-CoV-2.
79. Pence MA, Liesman R. Clinical microbiology. Em: Contemporary Practice in Clinical Chemistry. Elsevier; 2020. p. 985–1006.
80. Biomérieux. Sistema BIOFIRE® FILMARRAY® [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/sistema-filmarrayr-pcr-multiplex>
81. Biomérieux. The BioFire® Respiratory 2.1 (RP2.1) Panel [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.biofiredx.com/products/the-filmarray-panels/filmarrayrp/>
82. Biomérieux. Painel Respiratório FilmArray™ [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/painel-respiratorio-filmarraytm>
83. Biomérieux. The BioFire® FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.biofiredx.com/products/the-filmarray-panels/filmarrayme/>
84. Biomérieux. FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/filmarrayr-meningitisenkephalitis-me-panel>
85. HOLOGIC. Novodiag® System.
86. HOLOGIC. Novodiag® System. 2022.
87. Genomika. MICROARRAY [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://genomika.einstein.br/microarray/>
88. HOLOGIC. Novodiag® CarbaR+ Assay [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.hologic.com/hologic-products/molecular-diagnostics/novodiag-carbar-assay#4257225834-1531480606>
89. HOLOGIC. Novodiag® Stool Parasites Assay [Internet]. [citado 23 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.hologic.com/hologic-products/molecular-diagnostics/novodiag-stool-parasites-assay#4257225834-585355585>
90. Schwebke JR. Diagnostic methods for bacterial vaginosis. International Journal of Gynecology & Obstetrics. Novembro de 1999;67:S21–3.

91. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C, Tomaro-Duchesneau C, Coussa-Charley, et al. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets and Therapy*. Julho de 2011;71.
92. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio*. Maio de 2015;6(2).
93. Libório AM, Nishiwaki-Dantas MC, Mimica LMJ, Dantas PEC, Lima ALH. Microbiota conjuntival em pacientes com alergia ocular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. Dezembro de 2005;68(6).
94. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*. Dezembro de 2005;13(12):589–95.
95. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the Human Microbiome. *PLoS Computational Biology*. 2012;8(7).
96. Weber TK, Polanco I. Gastrointestinal microbiota and some children diseases: A review. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012;2012.
97. Gevers D, Knight R, Petrosino JF, Huang K, McGuire AL, Birren BW, et al. The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome. *PLoS Biology*. 2012;10(8):6–10.
98. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology*. Agosto de 2009;28(8):405–11.
99. Marsh P, Martin M. Marsh and Martin's oral microbiology. 6.<sup>a</sup> ed. 2016.
100. Barroso H, Meliço Silvestre A, Taveira N. *Microbiologia Médica*. Lidel. 2014;1.
101. SEIMC. INFECCIONES POR ÓRGANO/SISTEMA [Internet]. [citado 18 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://seimc.org/documentos-cientificos/infecciones-por-organo-sistema>
102. Prof. Doutor J. Melo Cristino. MANUAL DE COLHEITAS SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA CENTRO HOSPITALAR LISBOA NORTE. 2017.
103. Bord B, Pfeferman Heilberg I, Schor N. BORD. Vol. 49, Rev Assoc Med Bras. 2003.
104. Ghosh S, CK Jayaram P. Paniker's Textbook of Medical Parasitology. 7.<sup>a</sup> ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd; 2013.
105. Le Bailly M, Bouchet F. *Diphyllobothrium* in the past: Review and new records. *Int J Paleopathol*. 2013;
106. TECHLAB Inc. C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE ®. Em 2021.

107. Coris BioConcept. Teste para diagnóstico rápido in vitro para a detecção de carbapenemases OXA-48, KPC, NDM, VIM e IMP em cultura bacteriana. Em 2022.
108. Biomérieux. Gelose Chocolate PolyViteX (PVX) [Internet]. Disponível em: <http://www.biomerieux.com/techlib>.
109. Remel. Brain Heart Infusion Broth (BHI).
110. Becton Dickinson. BBL Fluid Thioglycollate Medium.
111. Biomérieux. Meios de cultura BACT/ALERT® [Internet]. [citado 17 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalert>
112. BD. BD BACTEC™ Plus Aerobic medium [Internet]. [citado 17 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-bactec-plus-aerobic-medium>
113. BD. BD BACTEC™ Plus Anaerobic medium [Internet]. [citado 17 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-bactec-plus-anaerobic-medium>
114. BD. BD BACTEC™ Peds Plus™ medium [Internet]. [citado 17 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.bing.com/search?q=Peds+Plus+Medium&qs=n&form=QBRE&sp=1&pq=peds+plus+medium&sc=7-16&sk=&cvid=F1F4535211344A59913EA6A87B6AFBDC&ghsh=0&ghacc=0&ghpl=>
115. Becton Dickinson. BD BBL™ MycoPrep™ [Internet]. [citado 3 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/microbiology-testing/bbl-mgit-mycobacterial-growth-indicator-tubes>
116. Biomérieux. Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS).
117. Biomérieux. Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3).
118. Thermo Scientific™. Legionella GVPC Selective Agar [Internet]. [citado 26 de Janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/legionella-gvpc-selective-agar/p-7000004>
119. Biomérieux. Gelose BLSE.
120. BIO-RAD. LOWENSTEIN-JENSEN [Internet]. Disponível em: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
121. Biomérieux. Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 agar [Internet]. [citado 31 de Março de 2023]. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/46-sabouraud-gentamicin-chloramphenicol-2-agar>
122. Todd Hewitt R. Todd Hewitt broth w/ colistin and nalidixic acid (Lim broth) [Internet]. Disponível em: [www.remel.com](http://www.remel.com)
123. Remel. Selenite broth w/ and w/o cystine [Internet]. Disponível em: [www.remel.com](http://www.remel.com)
124. Biomérieux. Gelose CHROMID® MRSA SMART (MRSM).

125. Biomériux. Gelose GRANADA™ (GRAN).
126. Biomériux. Gelose CHROMID® Candida (CAN2) [Internet]. Disponível em: <http://www.biomerieux.com/techlib>.
127. Biomériux. Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2).
128. Biomériux. Gelose Columbia ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA).
129. Becton Dickinson. BBL™ BCYE Agar [Internet]. 2017. Disponível em: [www.bd.com](http://www.bd.com).
130. Biomériux. Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC2).
131. ThermoFisher Scientific. LEGIONELLA CYE AGAR BASE [Internet]. [citado 11 de Janeiro de 2023]. Disponível em: [http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0655](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0655)
132. Biomériux. Gelose Mac Conkey (MCK) [Internet]. Disponível em: [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)
133. Biomériux. Gelose Hektoen (HEKT).
134. Prof.Dr.Luis Carlos Figueira de Carvalho. MEIOS DE CULTURA [Internet]. [citado 14 de Junho de 2023]. Disponível em: <https://profluiscarloscarvalho.comunidades.net/meios-de-cultura2>
135. Laborclin. Stuart-x-Amies.
136. AlphaTec. ETM [Internet]. [citado 31 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.alphatecsystems.com/bacteriology/etm-enteric-transport-medium/>
137. AlphaTec. PROTO-FIX [Internet]. [citado 31 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.alphatecsystems.com/parasitology/proto-fix-single-vial-parasitology-fixative/>
138. BIOER TECHNOLOGY. Viral Transport Medium (BSC85) [Internet]. [citado 31 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.bioer.com.cn/en/product/info.aspx?itemid=1643&lcid=8&ccid=44>
139. Biomérieux. Gelose Mueller Hinton E (MHE).
140. Biomériux. Gelose RPMI [Internet]. Disponível em: <http://www.biomerieux.com/techlib>.

## **5 Anexos**

### **Anexo 1 – Processamento de amostras biológicas**

Amostra	Exame	Lâminas		Meios		PML	Atmosfera obrigatória			Conservação após processamento
		Gram	Ziehl	Sólidos	Líquidos		CO <sub>2</sub>	µaerofilia	Anaeróbia	
Garrafa de hemocultura positiva	Medula óssea	X				GS, CHOC	GS, CHOC			Estufa
	Outras amostras	X				GS, MAC	GS			Estufa
Garrafa de hemocultura anaeróbia positiva		X				GS, MAC				Estufa
Aspirado traqueal e Expetoração	Bacteriológico	X	X	GS, MAC, HAE		GS, HAE				Refrigerada
	Cultural <i>Legionella</i> spp.			BCYE, GVPC						Refrigerada
Biópsia	Bacteriológico			GS, MAC	BHI	CNA, MAC				Refrigerada
Exsudado conjuntival	Bacteriológico			GS, CHOC e VCA (se RN)	Tood c/sangue	GS, CHOC	GS, CHOC, VCA			Refrigerada
Exsudado endocervical	Pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			CHOC, VCA			CHOC, VCA			Estufa
Exsudado faríngeo	Bacteriológico			GS	Tood c/sangue	CNA	GS, CNA			Refrigerada
	Pesquisa de Enterobacteriaceas produtoras de ESBL			ESBL						Refrigerada
	Pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			CHOC, VCA	Tood c/sangue		CHOC, VCA			Estufa
Exsudado nasal	Despiste de colonização por MRSA			MRSA						Refrigerada
Exsudado ouvido externo	Bacteriológico			GS, MAC, HAE			GS, HAE			Refrigerada

<b>Exsudado ouvido médio</b>	Bacteriológico	X		GS, MAC, HAE	BHI	GS, MAC, HAE	GS, HAE			Refrigerada
<b>Exsudado purulento profundo</b>	Bacteriológico	X		GS, MAC, CHOC	BHI	CNA, MAC, CHOC	CHOC			Refrigerada
<b>Exsudado purulento superficial</b>	Bacteriológico			GS, MAC	BHI	CNA, MAC				Refrigerada
<b>Exsudado retal</b>	Pesquisa de Enterobacteriaceas produtoras de ESBL			ESBL						Refrigerada
	Pesquisa de Streptococcus agalactiae				Tood AB	Granada	Granada			Refrigerada
	Pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			CHOC, VCA			CHOC, VCA			Estufa
<b>Exsudado úlcera/ferida</b>	Despiste de colonização por MRSA			MRSA						Refrigerada
<b>Exsudado uretral</b>	Microbiológico (exame a fresco)	X		GS, CHOC, VCA, SAB			GS, CHOC, VCA			Estufa
	Pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	X		CHOC, VCA			CHOC, VCA			Estufa
<b>Exsudado vaginal</b>	Microbiológico (exame a fresco)	X		GS, CHOC, VCA, SAB						Estufa
	Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i>				Tood AB	Granada	Granada			Refrigerada
<b>Exsudado/raspado da córnea</b>	Bacteriológico	X		GS, CHOC, VCA (se RN)	Tood c/sangue	GS, CHOC	CHOC, VCA			Estufa

Fezes	Bacteriológico			MAC, HKT, CAMPY (se Ag+)	SEL	MAC		CAMPY		Refrigerada
Humor vítreo e aquoso	Bacteriológico	X		GS, CHOC, SAB, MAC, VCA (se RN)	Tood c/sangue	GS, CHOC, SAB, MAC	CHOC, VCA			Estufa
LBA (centrifugar exceto em cultural bacteriológico)	Bacteriológico	X	X	GS, MAC, HAE			GS, HAE			Refrigerada
	Cultural <i>Legionella spp.</i>	X		BCYE, GVPC						Refrigerada
LCR (centrifugar)	Bacteriológico	X		GS, CHOC	BHI		GS, CHOC			Estufa
Líquido peritoneal/ascítico (centrifugar)	Bacteriológico	X		GS, MAC	BHI	CNA, MAC				Refrigerada
Líquido pleural (centrifugar)	Bacteriológico	X		GS, CHOC	BHI	GS, CHOC	GS, CHOC			Refrigerada
Medula óssea	Bacteriológico	X		GS, CHOC	BHI	GS, CHOC	CHOC			Estufa
Ponta de cateter	Bacteriológico			GS						Estufa
Prótese	Bacteriológico				THIO	GS				Estufa
Secreções brônquicas	Bacteriológico	X	X	GS, MAC, HAE			GS, HAE			Refrigerada
	Cultural <i>Legionella spp.</i>			BCYE, GVPC						Refrigerada
Urina	Bacteriológico			GS, MAC						Refrigerada
Válvula cardíaca	Bacteriológico				THIO	GS, CHOC, SAB, Leg				Estufa
Se solicitado em condições de anaerobiose: Exsudado purulento profundo;		X			GS, HK	THIO			HK, THIO	Refrigerada

Humor vítreo/aquoso; LCR e líquidos biológicos; Medula óssea; Biopsias.									
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tempos de incubação das placas de Petri (a maioria das amostras incuba 48 horas exceto)					
16-24 horas	3 dias	5-7 dias	10 dias	15 dias	21 dias
Urina (bacteriológico) Fezes (MSC e HKT) Rastreo MRSA	LBA LCR <i>Campylobacter</i>	Humor vítreo/aquoso (Tood) Anaeróbios <i>Aspergillus</i>	<i>Legionella</i>	<i>Actinomycetes</i>	<i>Brucella</i>

## **Anexo 2 – Carta TSA 648**

Antibiótico	Código	Concentração §	Intervalo de denominação ≤	Intervalo de denominação ≥	Indicações de utilização da FDA
Benzilpenicilina	p04n	0,125, 0,25, 1	0,03	0,5	<i>Staphylococcus</i> spp.
Teste de Screening de Cefoxitina	oxsf01n	6	NEG	POS	<i>Staphylococcus</i> spp.
Clindamicina	cm04n	0,06, 0,25, 1	0,125	4	**MSSA, **MSSE
Daptomicina	dap02n <sup>NS</sup>	0,5, 1, 2, 4, 16	0,12	8	<i>S. aureus</i> , **VSEfaeca
Eritromicina	e05n <sup>②</sup>	1, 2, 4, 8	0,25	8	**N/A
Ácido fusídico	fa01n	0,5, 1, 4	0,5	32	**N/A
Gentamicina	gm01n	8, 16, 64	0,5	16	<i>Staphylococcus</i> spp.
Resistência induzida a clindamicina	icr02n <sup>②</sup>	CM 0,5, CM/E 0,25/0,5	NEG	POS	<i>Staphylococcus</i> spp.
Levofloxacina	lev01n	0,25, 2, 8	0,12	8	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Linezolid	lnz02n	0,5, 1, 2	0,5	8	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i>
Moxifloxacina	mxf02n	0,25, 2, 8	0,25	8	**MSSA
Mupirocina	mup03n	1, 4	1	512	**N/A
Nitrofurantoina	ft01n	16, 32, 64	16	512	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Oxacilina	ox101n	0,5, 1, 2	0,25	4	<i>Staphylococcus</i> spp.
Rifampicina	ra03n	0,015, 0,03, 0,125, 0,5	0,03	4	**N/A
Teicoplanina	tec02n	0,5, 2, 8, 32	0,5	32	**N/A
Tetraciclina	te03n	0,5, 1, 2	1	16	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Trimetoprim/Sulfametoxazol	sxt04n <sup>①</sup>	2/38, 8/152, 16/304	10 (0,5/9,5)	320 (16/304)	<i>S. aureus</i>
Vancomicina	va04n <sup>②</sup>	1, 2, 4, 8, 16	0,5	32	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>

Os valores numéricos são expressos em µg/mL.

§ Concentração do método padrão equivalente por eficácia.

NEG = Negativo

POS = Positivo

<sup>c</sup> = A concordância de categoria foi estabelecida na altura da aprovação da FDA. A concordância essencial não foi estabelecida uma vez que o teste contém menos de cinco diluições discretas.

\*\*MSSA = *S. aureus* sensível a meticilina

\*\*MSSE = *S. epidermidis* sensível a meticilina

<sup>NS</sup> = A atual ausência de isolados resistentes exclui a definição de quaisquer outros resultados além dos sensíveis. Os isolados que produzirem resultados CMI sugestivos de uma categoria Não sensível devem ser enviados para um laboratório de referência para a realização de mais testes.

\*\*VSEfaeca = *E. faecalis* (estirpes sensíveis à vancomicina)

①, ② etc. = Consultar as características de comportamento funcional identificadas pelo código de antibiótico com este símbolo.

\*\*N/A = Não estão disponíveis Indicações de utilização específicas da FDA

### **Anexo 3 – Carta TSA 586**

Antibióticos	Código	Concentração §	Intervalo de CMI		Indicações de utilização da FDA
			≤	≥	
Ampicillin <i>Enterococcus</i> spp. <i>S. agalactiae</i>	AM	0.5, 4, 8, 32	- 2 0.25	- 32 16	<i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Ampicillin/Sulbactam	SAM	4/2, 8/4, 16/8, 64/32	2/1	32/16	<i>Staphylococcus</i> spp.
Benzylpenicillin	P	0.125, 0.25, 1, 2, 8, 64	0.12	64	<i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Cefuroxime	CXM	1, 4, 16	1	64	N/A**
Clindamycin	CM	0.5, 1, 2	0.25	8	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Erythromycin	E ❶	0.25, 0.5, 2	0.25	8	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Gentamicin High Level (synergy)	HLG	500	S	R	<i>Enterococcus</i> spp.
Imipenem	IPM	2, 4, 8	1	16	N/A**
Levofloxacin	LEV	0.25, 2, 8	0.12	8	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Linezolid	LNZ	0.5, 1, 2	0.5	8	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i>
Moxifloxacin	MXF	0.25, 2, 8	0.25	8	MSSA**
Nitrofurantoin	FT	16, 32, 64	16	512	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Quinupristin/Dalfopristin	QDA	0.25, 0.5, 2	0.25	16	MSSA**, <i>S. epidermidis</i> , VREF**, <i>S. agalactiae</i>
Streptomycin High Level (synergy)	HLS	1000	S	R	<i>Enterococcus</i> spp.
Teicoplanin	TEC	1, 4, 8, 16	0.5	32	N/A**
Tetracycline	TE	0.5, 1, 2	1	16	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>
Tigecycline <sup>NS</sup>	TGC	0.25, 0.5, 1	0.12	2	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. casseliflavus</i>
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT ❷	8/152, 16/304, 32/608	10 (0.5/9.5)	320 (16/304)	N/A**
Vancomycin	VA ❸	1, 2, 4, 8, 16	0.5	32	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i>

Os valores numéricos são expressos em µg/ml.

§ Concentrações equivalentes em eficácia ao método padrão.

\*\*N/A = Não existem indicações específicas da FDA relativas à utilização

❶, ❷ etc. = Ver as características de comportamento funcional identificadas pelo código do antibiótico com este símbolo nos Comentários do folheto informativo.

\*\*MSSA = *S. aureus* sensível à metacilina

\*\*VREF = *E. faecium* resistente à vancomicina

<sup>NS</sup> = A ausência actual de isolados resistentes exclui a definição de quaisquer outros resultados que não os sensíveis.

Os isolados com resultados de CMI sugestivos para categorias não sensíveis devem ser submetidos a um laboratório de referência para testes complementares.

## **Anexo 4 – Carta AST N355**

Antibióticos	Código	Concentração §	Intervalo de CMI		Indicações de utilização da FDA
			≤	≥	
Amikacin	AN	8, 16, 64	2	64	CSAGNB**
Amoxicillin/Clavulanic Acid	AMC	4/2, 8/2, 32/2	2	32	N/A**
Ampicillin	AM	4, 8, 32	2	32	CSAGNB**
Cefepime	FEP	2, 8, 16, 32	1	64	CSAGNB**
Cefotaxime	CTX	1, 4, 16, 32	1	64	CSAGNB**
Ceftazidime	CAZ	1, 2, 8, 32	1	64	CSAGNB**
Cefuroxime	CXM	2, 8, 32	1	64	CSAGNB**
Ciprofloxacin	CIP	0.5, 2, 4	0.25	4	CSAGNB**
Colistin	CS	4, 16, 32	0.5	16	N/A**
Ertapenem	ETP	0.03, 0.12, 0.5, 2	0.12	8	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , Kox(-ESBL)***, <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Pv. rettgeri</i> , <i>Pv. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
ESBL	ESB	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4	NEG	POS	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
Fosfomicin	FOS	8, 16, 32	16	256	N/A**
Gentamicin	GM	4, 16, 32	1	16	CSAGNB**
Meropenem	MEM②	0.5, 2, 6, 12	0.25	16	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>C. diversus</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. multocida</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.
Nitrofurantoin	FT	16, 32, 64	16	512	CSAGNB**
Piperacillin/Tazobactam	TZP	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. koseri</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Pv. rettgeri</i> , <i>Pv. stuartii</i> , <i>S. enterica</i>
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT②	1/19, 4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>M. morgani</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , Eco(+ETEC)***, <i>C. sakazakii</i>

§ Concentrações equivalentes em eficácia ao método padrão.

\*\*CSAGNB = Bacilos Gram-negativos aeróbios com significado clínico

\*\*N/A = Não existem indicações específicas da FDA relativas à utilização

◇ = Não inclui todo o intervalo de diluição recomendado pelo CLSI/FDA para testes de CQ com este microrganismo.

\*\*Kox(-ESBL) = *K. oxytoca* (excluindo estirpes produtoras de BLSE)

Nota: para BLSE, FEP é cefepima, CTX é cefotaxima, CAZ é ceftazidima e CA é ácido clavulânico. Para estirpes BLSE positivas, o resultado do teste deve ser interpretado como de resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam.

NEG = negativo

POS = positivo

Um resultado de teste BLSE negativo não exclui a presença de uma BLSE mascarada por uma beta-lactamase AmpC.

①, ② etc. = Ver as características de comportamento funcional identificadas pelo código do antibiótico com este símbolo nos Comentários do folheto informativo.

\*\*Eco(+ETEC) = *E. coli* (incluindo estirpes/cepas enteropatogênicas sensíveis implicadas em diarreia de viajantes)

## **Anexo 5 – Carta AST N373**

Antibiótico	Código	Concentração §	Intervalo de deno-minação ≤	Intervalo de deno-minação ≥	Indicações de utilização da FDA
Amicacina	an03n	2, 4, 16, 48	1	64	**N/A
Aztreonam	atm01n	2, 8, 32	1	64	**CSAGNB
Cefepima	fep03n	0,25, 1, 4, 16, 32	0,12	32	<i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. koseri</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Ceftazidima	caz02n	0,25, 1, 2, 8, 32	0,12	64	**N/A
Ceftolozano/Tazobactam	ct01n	0,5/4, 1/4, 4/4, 8/4, 32/4	0,25	32	<i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. liquefaciens</i>
Ciprofloxacina	cip02n	0,06, 0,12, 0,5, 1	0,06	4	**N/A
Gentamicina	gm02n	4, 8, 32	1	16	<i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>
Imipenem	ipm04n	1, 2, 6, 12	0,25	16	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>M. morgani</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. stuartii</i>
Levofloxacina	lev02n <sup>Ⓢ</sup>	0,25, 0,5, 2, 8	0,12	8	<i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>A. lwoffii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>C. sakazakii</i>
Meropenem	mem02n <sup>Ⓢ</sup>	0,5, 2, 6, 12	0,25	16	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>C. diversus</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. multocida</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.

Piperacilina/Tazobactam	tzp03n <sup>c</sup>	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. koseri</i> , <i>M. organii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. enterica</i>
Rifampicina	ra01n	2, 4, 16	2	32	**N/A
Ticarclina	tic01n	16, 32, 64	8	128	**CSAGNB
Tigeciclina	tgc02n	1,5, 4, 8	0,5	8	<i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. marcescens</i>
Tobramicina	tm02n	8, 16, 64	1	16	<i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>M. organii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Serratia</i> spp.
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	sxt02n <sup>②</sup>	1/19, 4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>M. organii</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , **Eco(+ETEC), <i>C. sakazakii</i>

Os valores numéricos são expressos em µg/mL.

§ Concentração do método padrão equivalente por eficácia.

<sup>c</sup> = A concordância de categoria foi estabelecida na altura da aprovação da FDA. A concordância essencial não foi estabelecida uma vez que o teste contém menos de cinco diluições discretas.

① ② etc. = Consultar as características de comportamento funcional identificadas pelo código de antibiótico com este símbolo.

\*\*N/A = Não estão disponíveis Indicações de utilização específicas da FDA

\*\*CSAGNB = Bacilos gram-negativos aeróbios de relevância clínica

\*\*Eco(+ETEC) = *E. coli* (incluindo estirpes enterotoxigénicas sensíveis implicadas na diarreia do viajante)

## **Anexo 6 – Carta AST N576**

Antibiótico	Código	Concentração §	Intervalo de denominação ≤	Intervalo de denominação ≥	Indicações de utilização da FDA
Amoxicilina	amx03n <sup>②</sup>	0,06, 0,25, 1, 2	0,06	8	<i>S. pneumoniae</i>
Benzilpenicilina	p01n	0,03, 0,06, 0,25, 0,5	0,06	2	<i>S. pneumoniae</i>
Cefotaxima	ctx01n	0,06, 0,25, 0,5, 1	0,06	4	<i>S. pneumoniae</i>
Ceftriaxona	cro01n	0,06, 0,25, 0,5, 1	0,06	4	<i>S. pneumoniae</i>
Cloranfenicol	c01n	2, 8, 16	2	32	<i>S. pneumoniae</i>
Eritromicina	e04n <sup>c②</sup>	0,06, 0,125, 0,25	0,25	1	<i>S. pneumoniae</i>
Imipenem	ipm03n <sup>②</sup>	0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1	0,03	4	<i>S. pneumoniae</i>
Levofloxacina	lev02n	0,5, 1, 2	0,5	8	<i>S. pneumoniae</i>
Linezolid	lnz01n	1	2	4	<i>S. pneumoniae</i>
Moxifloxacina	mxf01n	0,25, 1, 2	0,25	4	<i>S. pneumoniae</i>
Ofloxacina	ofl01n	1, 2, 4	1	8	<i>S. pneumoniae</i>
Pristinamicina	pt01n	0,5, 1	2	4	**N/A
Quinupristina/Dalfopristina	qda02n	0,25, 0,5, 1	0,25	4	**N/A
Rifampicina	ra02n	0,25, 0,5, 1	0,25	4	**N/A
Esparfloxacina	spx02n	0,125, 0,25, 1	0,125	4	<i>S. pneumoniae</i>
Telitromicina	tel03n	0,06, 0,25, 1, 4	0,25	4	<i>S. pneumoniae</i>
Tetraciclina	te01n	0,5, 1, 2	1	16	<i>S. pneumoniae</i>
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	sxt01n	2/38, 8/152, 16/304, 32/608	10 (0,5/9,5)	320 (16/304)	<i>S. pneumoniae</i>
Vancomicina	va01n	0,5, 1	1	2	<i>S. pneumoniae</i>

Os valores numéricos são expressos em µg/mL.

§ Concentração do método padrão equivalente por eficácia.

①. ② etc. = Consultar as características de comportamento funcional identificadas pelo código de antibiótico com este símbolo.

<sup>c</sup> = A concordância de categoria foi estabelecida na altura da aprovação da FDA. A concordância essencial não foi estabelecida uma vez que o teste contém menos de cinco diluições discretas.

\*\*N/A = Não estão disponíveis Indicações de utilização específicas da FDA

**Anexo 7 – Testes rápidos no LMCBM antes do exame cultural,  
diretamente da amostra**

- **Campylobacter MonlabTest® (Monlab)**

É um TIC qualitativo de fluxo lateral, com objetivo de detetar *Campylobacter* em amostras de fezes humanas. A membrana contém anticorpos contra antígenos de *Campylobacter* na região de linha de teste, onde a amostra reage com a partícula revestida com anticorpos anti-*Campylobacter*. A mistura migra pela membrana e em caso de resultado positivo, os anticorpos específicos presentes na membrana vão reagir com a mistura do conjugado e provocar uma linha colorida. A linha de controlo é verde constituindo um controlo interno de reagentes e a boa execução da técnica.



- **BinaxNOW™ Streptococcus pneumoniae Antigen Card (Abbott)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar o antígeno pneumocócico solúvel na urina e no LCR. O antígeno pneumocócico na amostra reage para ligar o anticorpo do conjugado anti-*S.pneumoniae*. Os complexos de antígeno-conjugado resultantes são capturados pelo anticorpo anti-*S pneumoniae* imobilizado, formando a linha de teste. O anticorpo de controlo imobilizado captura o conjugado de anti-espécies, formando a linha de controlo.



- **BinaxNOW™ Legionella Urinary Antigen Card (Abbott)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar o antígeno solúvel de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 na urina. O antígeno urinário de *L. pneumophila* serogrupo 1 presente na amostra é capturado pelo anticorpo anti-*L. pneumophila* serogrupo 1 que está imobilizado, reage para ligar o anticorpo conjugado, formando a linha de teste. O anticorpo de controlo imobilizado captura o conjugado de anti-espécies, formando a linha de controlo.



- **Bioline™ ROTA/ADENO (Abbott)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar qualitativamente a presença de antígeno de rotavírus e/ou adenovírus em amostras fecais humanas. O antígeno de rotavírus se presente na amostra, irá ligar-se aos conjugados anti-rotavírus, que será capturado na membrana pelo anticorpo anti-rotavírus formando uma linha, indicando um teste positivo para rotavírus. Já se o antígeno de adenovírus estiver presente na amostra, irá liga-se aos conjugados anti-adenovírus, que será capturado na



membrana pelo anticorpo anti-adenovírus, formando uma linha, indicando um teste positivo para adenovírus.

- **C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE (TECHLAB®)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar em simultâneo o antígeno glutamato desidrogenase e as toxinas A e B do *Clostridium difficile* num único poço de reação, utilizando os anticorpos específicos destes dois componentes. O dispositivo contém uma janela de reação com três linhas verticais de anticorpos imobilizados (106).



A amostra é adicionada a um tubo com diluente e conjugado, que é aplicado ao poço de amostras e incubado à temperatura ambiente, onde qualquer glutamato desidrogenase e toxinas A e B da amostra se ligam aos conjugados peroxidase-anticorpo. Os complexos de conjugados antígeno-anticorpo migram para a membrana onde são capturados pela glutamato desidrogenase imobilizada específica e anticorpos específicos das toxinas A e B nas linhas. A janela de reação é lavada com um tampão, seguido do substrato. Linhas azuis indicam teste positivo, já a linha azul pontilhada vertical, confirma a validade do teste.

Abaixo encontram-se as interpretações de resultados do teste para diagnóstico rápido in vitro para a deteção de *C.difficile*

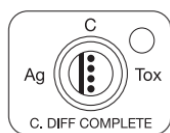


Figura 1a  
Resultado de Antígeno  
Positivo

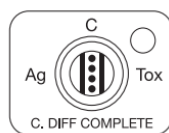


Figura 1b  
Resultado de Antígeno e  
Toxina Positivo

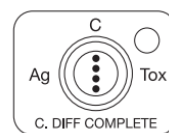


Figura 1c  
Resultado Negativo

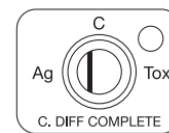


Figura 1g  
Resultado Inválido

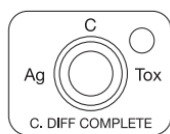


Figura 1d  
Resultado Inválido

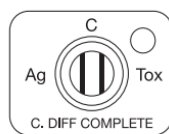


Figura 1e  
Resultado Inválido

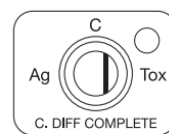


Figura 1f  
Resultado Inválido

- **Giardia/Cryptosporidium QUIK CHEK™ (TECHLAB®)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar qualitativamente, de forma simultânea e diferenciada, o antígeno de cistos de *Giardia* e oócitos de *Cryptosporidium* num único poço de reação. Utiliza anticorpos monoclonais e policlonais para antígenos de superfície celular dos organismos. O dispositivo contém a janela de reação com três linhas verticais com um anticorpo monoclonal imobilizado contra o respetivo agente etiológico, já a linha de controlo



contêm anticorpos anti-peroxidase de rábano. O conjugado consiste em anticorpos policlonais acoplados à peroxidase de rábano. Durante a incubação, os antígenos de cistos e/ou oocistos da amostra ligam-se aos conjugados anticorpo-peroxidase. Os complexos de conjugados antígeno-anticorpo migram pela membrana onde são capturados pelos anticorpos específicos de *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* imobilizados na linha de teste. A janela de reação é lavada com um tampão, seguido do substrato. Os aparecimentos de linhas azuis indicam um teste positivo, já o pontilhado corresponde ao controlo, indicando a validade do teste.

Este teste é utilizado se a amostra do doente sem qualquer tipo de tratamento com NaCl, consistir em diarreia, se o doente for imunossuprimido (HIV), se for um doente transplantado ou se forem fezes diarreicas de crianças.

- ***Entamoeba histolytica* QUIK CHEK™ (TECHLAB®)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar qualitativamente a adesina de *Entamoeba histolytica*, utilizando anticorpos específicos. O dispositivo contém a a linha de teste com anticorpos monoclonais específicos imobilizados para adesina e a linha de controlo contém



anticorpos ligados a peroxidase de rábano. O conjugado consiste em anticorpos de *E. histolytica* ligados a peroxidase de rábano. Durante a incubação, qualquer adesina de *E. histolytica* na amostra liga-se ao conjugado de anticorpo-peroxidase, formando um complexo antígeno-anticorpo-peroxidase que migra pela membrana, sendo capturados pelos anticorpos antiadesina imobilizados na linha de teste. A janela de reação é lavada com um tampão, seguido do substrato. Os aparecimentos de linhas azuis representam um teste positivo e a validade do teste.

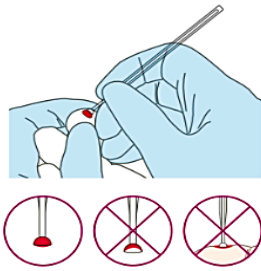
Este teste é utilizado se a amostra fecal do doente sem qualquer tipo de tratamento com NaCl, for diarreia ou disenteria.

- **Bioline™ MALARIA Ag P.f/Pan (Abbott)**

É um TIC de membrana, com objetivo de diagnosticar diferencialmente a malária, por deteção do antígeno HRP2 da malária *Plasmodium falciparum* e do antígeno pLDH de espécies *Plasmodium* (Pan) em sangue total.

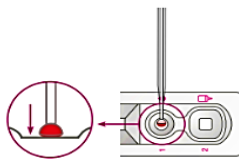
Abaixo encontra-se o procedimento do teste para diagnóstico rápido in vitro para a deteção do antígeno HRP2 da malária e do antígeno pLDH de espécies *Plasmodium* e a interpretação de resultados, respetivamente.

Usar o copo invertido para colher a gota de sangue.

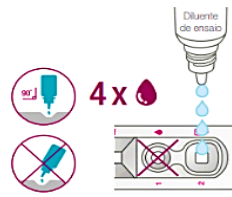


Adicionar a amostra retirada de sangue ao poço redondo de amostra (●).

Deitar fora o copo invertido na caixa para objetos perfurocortantes após a adição do sangue.



Adicionar **4 gotas** de diluente de ensaio no poço quadrado para diluente de ensaio (◻).

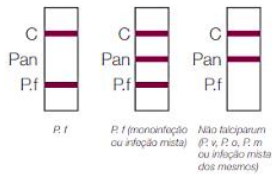


Interpretar os resultados do teste dentro de **15 minutos** (até 30 minutos) após a adição do diluente de ensaio.

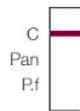
Cuidado: a presença de qualquer linha, mesmo que muito desbotada, é considerada como um resultado positivo.

A linha de controlo deve aparecer para todos os resultados. Se ela não aparecer, o resultado será considerado inválido e a amostra deverá ser reanalisada utilizando um novo kit de teste.

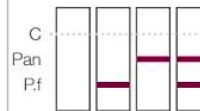
### ⊕ Positivo



### ⊖ Negativo



### ⊗ Inválidos



**Anexo 8 – Testes rápidos no LMCBM depois da amostra do exame cultural, a partir das colónias isoladas**

- **Clearview™ PBP2a SA Culture Colony Test (Abbott)**

É um TIC in vitro qualitativo, com objetivo de detetar rapidamente a proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a) em isolados identificados como *Staphylococcus aureus* como um auxiliar na identificação de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

(MRSA), através de fragmentos de anticorpos monoclonais recombinantes altamente sensíveis. Estes fragmentos e uma proteína de controlo são imobilizados na membrana de nitrocelulose para formação ou não das linhas cor-de-rosa/roxo.



- **Cleariew® Strep A Cassette 2 (Abbott)**

É um TIC de membrana, com objetivo de detetar o antígeno de hidrato de carbono de *Streptococcus*, através de um anticorpo específico ao antígeno do mesmo na linha de teste. A amostra reage com as partículas revestidas de anticorpos de *Streptococcus* A aplicadas na membrana de adsorção da amostra. A amostra migra pela membrana, em caso de aparecimento de uma linha vermelha na região da linha teste, o teste é positivo e a linha vermelha na região da linha de controlo, comprova a validade do método.



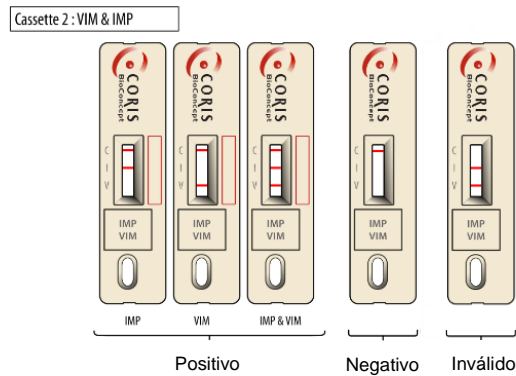
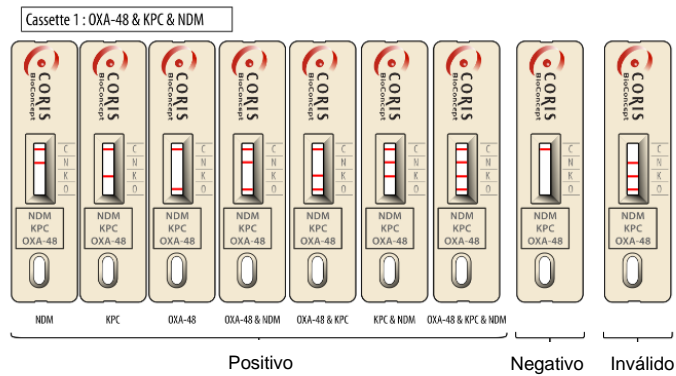
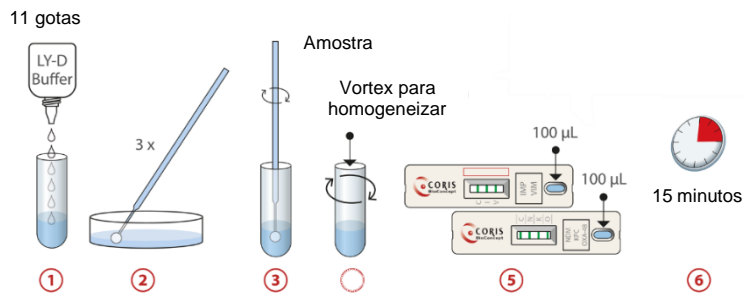
- **O.K.N.V.I. RESIST-5 (Coris BioConcept)**

É um TIC in vitro de forma a detetar e identificar carbapenemases OXA-48, KPC, NDM, VIM e IMP em culturas bacterianas. Existem 2 cassetes de fluxo lateral para identificação de:

- i. OXA-48, KPC, NDM – a membrana é sensibilizada com quatro anticorpos monoclonais dirigidos para cada uma das carbapenemases (linha “O” – OXA-48; Linha “K” – KPC; Linha “N” – NDM) e com um reagente para o controlo que valida o teste (Linha “C”);
- ii. VIM e IMP - a membrana é sensibilizada com três anticorpos monoclonais dirigidos para cada uma das carbapenemases (linha “V” – VIM; Linha “I” – IMP) e com um reagente de captura para controlo que valida as condições do teste (Linha “C”)(107).

Quando o tampão fornecido, que contém as bactérias em ressuspensão, entra em contacto com a membrana, os conjugados solubilizados migram com a amostra por difusão passiva e os conjugados e o material da amostra entram em contacto com os anticorpos respetivos imobilizados, que se encontram adsorvidos na membrana. Se a amostra contiver algumas das carbapenemases indicadas, os complexos formados pelos conjugados permanecerão ligados às linhas específicas respetivas. A migração continua e tanto os conjugados como o material da amostra entram em contacto com o reagente da linha de controlo, que se liga a um conjugado de controlo (linha “C”), produzindo assim uma linha vermelha.

Abaixo pode ser observado o procedimento do teste para detecção de carbapenemases OXA-48, KPC, NDM, VIM e IMP e a interpretação de resultados, respetivamente.



## **Anexo 9 – Microrganismos detetados e identificados pelas TAAN**

- Allplex™ Painei de Ensaio Gastrointestinais (Seegene)

**Allplex™**  
**GI-Bacteria(II) Ensaio**

- CEEA<sup>[1]</sup> (*aggR*)
- EPEC<sup>[2]</sup> (*eaeA*)
- *Escherichia coli* O157 (*E. coli* O157)
- ETEC<sup>[3]</sup> (*lt/st*)
- *Clostridium difficile* hipervirulento (CD hiper)
- STEC<sup>[4]</sup> (*stx1/2*)
- Controle Interno (CI)

**Allplex™**  
**GI-Bactérias(I) Ensaio**

- *Aeromonas* spp. (Aer)
- *Campylobacter* spp. (Cam)
- *Clostridium difficile* toxina B (CdB)
- *Salmonella* spp. (Sal)
- *Shigella* spp./EIEC<sup>[5]</sup> (Sh/EI)
- *Vibrio* spp. (Vib)
- *Yersinia enterocolitica* (Yer)
- Controle Interno (CI)

**Allplex™**  
**GI-Parasite Ensaio**

- *Blastocystis hominis* (BH)
- *Cryptosporidium* spp. (CR)
- *Cyclospora cayetanensis* (CC)
- *Dientamoeba fragilis* (DF)
- *Entamoeba histolytica* (EH)
- *Giardia lamblia* (GL)
- Controle Interno (CI)

**Allplex™**  
**GI-Virus Ensaio**

- Adenovirus (AdV)
- Astrovirus (AstV)
- Norovirus GI (NoV-GI)
- Norovirus GII (NoV-GII)
- Rotavirus (RotV)
- Sapovirus (SV)
- Controle Interno (CI)

[1] *E. coli* enteroagregativa

[2] *E. coli* enteropatogênica

[3] *E. coli* enterotoxigênica

[4] *E. coli* produtora de toxina Shiga

[5] *Shigella* spp./*Escherichia coli* enteroinvasiva

[6] Para utilização apenas com o Seegene NIMBUS & STARlet.

- Allplex™ Ensaio de úlcera genital (Seegene)

**Allplex™**  
**Genital ulcer Assay**

- *Cytomegalovirus* (CMV)
- *Haemophilus ducreyi* (HD)
- Herpes simplex virus type 1 (HSV1)
- Herpes simplex virus type 2 (HSV2)
- Lymphogranuloma venereum (LGV)
- *Treponema pallidum* (TP)
- Varicella-zoster virus (VZV)
- Internal Control (IC)

- Anyplex™ II Deteção HR HPV (Seegene)

**Anyplex™ II  
HPV HR Detection**

**14 High-risk HPV types**

- Human Papillomavirus 16 (HPV 16)
- Human Papillomavirus 18 (HPV 18)
- Human Papillomavirus 31 (HPV 31)
- Human Papillomavirus 33 (HPV 33)
- Human Papillomavirus 35 (HPV 35)
- Human Papillomavirus 39 (HPV 39)
- Human Papillomavirus 45 (HPV 45)
- Human Papillomavirus 51 (HPV 51)
- Human Papillomavirus 52 (HPV 52)
- Human Papillomavirus 56 (HPV 56)
- Human Papillomavirus 58 (HPV 58)
- Human Papillomavirus 59 (HPV 59)
- Human Papillomavirus 66 (HPV 66)
- Human Papillomavirus 68 (HPV 68)
- Internal Control (IC)

- Painei Respiratório (FilmArray)

VIRUSES		BACTERIA
Adenovirus	Influenza A	<i>Bordetella pertussi</i>
Coronavirus 229E	Influenza A/H1	<i>Bordetella parapertussis</i>
Coronavirus HKU1	Influenza A/H1-2009	<i>Chlamyphila pneumoniae</i>
Coronavirus NL63	Influenza A/H3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Coronavirus OC43	Influenza B	
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)	Parainfluenza Virus 1	
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	Parainfluenza Virus 2	
Human Metapneumovirus	Parainfluenza Virus 3	
Human Rhinovirus/Enterovirus	Parainfluenza Virus 4	
	Respiratory Syncytial Virus	

- Painei Meningites (FilmArray)

BACTERIA	VIRUSES	YEAST
<i>Escherichia coli K1</i>	Cytomegalovirus (CMV)	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Enterovirus (EV)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Human Herpesvirus 6 (HHV-6)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Human Parechovirus (HPeV)	
	Varicella Zoster Virus (VZV)	

- Painel Parasitas (Novodiag)

### Targets

- *Ancylostoma duodenale*
- *Ascaris lumbricoides/suum*
- *Balantidium coli*
- *Blastocystis spp.*
- *Clonorchis sinensis/Opisthorchis spp./Metorchis spp.*
- *Cryptosporidium spp.*
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Cystoisospora belli*
- *Dientamoeba fragilis*
- *Diphyllobothrium latum/nihonkaiense*
- *Encephalitozoon spp.*
- *Entamoeba histolytica*
- *Enterobius vermicularis*
- *Enterocytozoon bieneusi*
- *Fasciola spp.*
- *Fasciolopsis buski*
- *Giardia intestinalis*
- *Hymenolepis nana*
- *Necator americanus*
- *Schistosoma mansoni*
- *Schistosoma spp.*
- *Strongyloides stercoralis*
- *Taenia saginata/asiatica*
- *Taenia solium*
- *Trichuris spp.*

- Painel CarbaR+ (Novodiag)

Targets	Variants included (at least)	Pure culture		Rectal swabs	
		PPA	NPA	PPA	NPA
<b>KPC</b>	KPC-1 through KPC-24	100%	100%	100%	100%
<b>NDM</b>	NDM-1 through NDM-16	100%	100%	100%	100%
<b>VIM</b>	VIM-1 through VIM-20; VIM-23 through VIM-46	100%	100%	100%	99.5%
<b>IMP</b>	IMP-1 through IMP-17; IMP-19 through IMP-35; IMP-37; IMP-38; IMP-40 through IMP-45; IMP-47; IMP-48; IMP-51; IMP-53	88.9%	100%	91.7%	100%
<b>OXA-23</b>	OXA-23; OXA-27; OXA-49; OXA-73; OXA-103; OXA-133; OXA-134; OXA-146; OXA-165 through OXA-171; OXA-225; OXA-239	100%	100 %	93.8%	100%
<b>OXA-24</b>	OXA-24 through OXA-26; OXA-40; OXA-72; OXA-139; OXA-160; OXA-207	100%	100 %	100%	99%
<b>OXA-48/181</b>	OXA-48; OXA-162; OXA-163; OXA-181; OXA-204; OXA-232; OXA-244; OXA-245; OXA-247; OXA-252; OXA-370; OXA-405; OXA-438; OXA-484; OXA-517; OXA-519	100%	100 %	95.6%	100%
<b>OXA-51*</b>	OXA-51; OXA-64 through OXA-71; OXA-75 through OXA-80; OXA-82 through OXA-84; OXA-86 through OXA-95; OXA-98 through OXA-100; OXA-104; OXA-106 through OXA-113; OXA-115; OXA-117; OXA-120 through OXA-128; OXA-130 through OXA-132; OXA-138; OXA-144; OXA-148 through OXA-150; OXA-172 through OXA- 180; OXA-194 through OXA-197; OXA-200 through OXA-203; OXA-206; OXA-208; OXA-216; OXA-217; OXA-219; OXA-223; OXA-241; OXA-242; OXA-248 through OXA-250; OXA-254	n/a	100%	100%	100%
<b>OXA-58</b>	OXA-58; OXA-96; OXA-97; OXA-164	100%	98.8%	92.9%	97.6%
<b>MCR-1</b>	MCR-1	100%	100%	100%	100%

PPA = Positive Percent Agreement, NPA = Negative Percent Agreement  
 \*Detected only when promoter ISAbal is present  
 N= 87 pure cultures, 211 rectal swabs









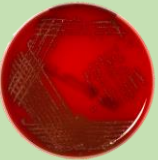

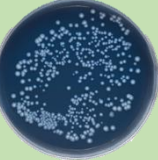



## **Anexo 10 – Microrganismos patogénicos considerados pela SEIMC**


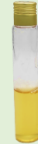
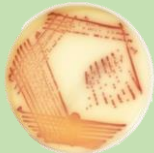

Bacteriologia	Virologia	Parasitologia	Levedura e Fungos	Micobactérias
<i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Corynebacterium</i> , <i>Listeria</i> e outros Gram+ <i>Neisseria</i> <i>Moraxella</i> Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> e outros Gram- não fermentadores <i>Haemophilus</i> e outros microrganismos exigentes <i>Legionella</i> e outras bactérias causadoras de pneumonia Anaeróbios <i>Sífilis</i> e <i>Borrelia</i>	Vírus da Hepatite Citomegalovírus, Vírus Herpes Simplex e outros Herpevírus Influenza e outros vírus que causam infecção respiratória Vírus gastroentéricos Parvovírus e Eritrovírus B19 Vírus da imunodeficiência humana (VIH) Outros vírus: Rubéola, Ecovírus, Arbovírus e outros	<i>Plasmodium</i> <i>Leishmania</i> <i>Cryptosporidium</i> <i>Ciclospora</i> <i>Giardia</i> <i>Anisakis</i> <i>Dientamoeba</i> <i>Taenia</i> <i>Trypanosoma</i> <i>Filaria</i> <i>Amoeba</i> <i>Acanthamoeba</i> <i>Strongyloides</i>	Leveduras	<i>Mycobactererium</i> <i>tuberculosis</i> <i>Mycobactererium</i> <i>kansasii</i> <i>Mycobactererium</i> <i>smegmatis</i> <i>Mycobactererium</i> <i>chelonae</i> <i>Mycobactererium</i> <i>gordonae</i> <i>Mycobactererium</i> <i>fortuitum</i>
			<i>Candida</i>	
			Fungos dermatófitos	
			<i>Trichophyton tonsurans</i>	
			Fungos filamentosos	
<i>Aspergillus</i> spp. <i>Scedosporium</i> <i>Penicillium marneffeii</i> <i>Fusarium</i>				




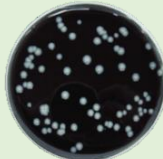

## **6 Apêndices**

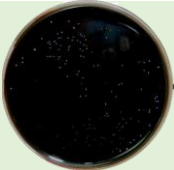

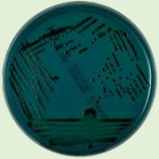


### **Apêndice 1 – Meios de cultura**







Tipo	Meio	Estado	Objetivo	Ilustração
Enriquecimento Não seletivo	Chocolate PolyViteX (PVX)	Sólido	Isolar bactérias exigentes, especialmente gêneros <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> e de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (108). Fatores X (hemina) e V (NAD) são produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX™ (108). Pode ser utilizado para TSA. Controle de qualidade: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 43069™ e <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211™, durante 24 horas (108)	
	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)	Líquido	Cultivar microrganismos fastidiosos e não fastidiosos como bactérias, leveduras e bolores, e para inóculo em TSA e microdiluição em caldo para determinação de CIM (109). Recomendado pela <i>Food and Drug Administration</i> para procedimentos qualitativos (109). Peptonas e infusões de tecido cerebral e cardíaco contém proteínas e outros nutrientes necessários para crescimento de bactérias. O cloreto de sódio fornece eletrólitos que mantém o equilíbrio osmótico. O fosfato dissódico atua como um tampão e a dextrose é uma fonte de energia (109). Controle de qualidade: <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™, <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923, durante 24 horas (109).	
	Tioglicolato	Líquido	Crescimento de bactérias aeróbias, microaerófilas e anaeróbias (110). Tioglicolato de sódio e cistérina atuam como agentes redutores, o agar impede a difusão de oxigênio para o fundo do tubo, para crescimento de anaeróbios nessa zona(110).	
	BacT/ALERT®	Líquido	Enriquecer para multiplicação e detecção de bactérias fastidiosas e não fastidiosas, micobactérias, fungos e leveduras em amostras de sangue, utilizando o sistema BacT/ALERT® Virtuo® (bioMérieux, Inc.)(111).	
	BD BACTEC	Líquido	Enriquecer para multiplicação e detecção de micobactérias(112–114).	
	BD BACTEC™ MGIT™	Líquido	Digerir e descontaminar amostras clínicas exceto urina e sangue, de forma a detetar e recuperar micobactérias(115). O meio tem diversos componentes como o ácido oleico que é utilizado pelos bacilos tubérculos, com grande importância no metabolismo de micobactérias, a albumina que funciona como um agente protetor que liga os ácidos gordos livres, os quais são tóxicos às espécies de <i>Mycobacterium</i> , aumentando a sua recuperação, a dextrose que é a fonte de energia e a catalase que destrói os peróxidos tóxicos que podem estar presentes no meio(115).	


	Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Sólido	<p>Isolar bactérias fastidiosas e detetar hemólise (116). Crescimento da maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math> – hemólise: coloração esverdeada à volta da colónia;</li> <li>• <math>\beta</math> – hemólise: coloração clara à volta e em baixo da colónia;</li> <li>• <math>\gamma</math> – hemólise: sem hemólise (116)</li> </ul> <p>Controlo de qualidade: <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615™ (<math>\beta</math> – hemólise) e <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™ (<math>\alpha</math> – hemólise), incubação 24 horas (116)</p>	
Seletivo	Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)	Sólido	<p>Isolar <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> (117) Fatores X (hemina) e V (NAD) são produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX™ (117) Seletivo devido à presença de antibióticos e antifúngicos (117) Controlo de qualidade: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 43069™ (incubação em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>) e <i>Candida albicans</i> ATCC® 60193™, incubação 48 horas (117)</p>	
	Glycine Vacomycin Polymyxin Cyclohemixide (GVPC)	Sólido	<p>Isolar <i>Legionella</i>(118). Não contém antibiótico ao contrário do meio de cultura BCYE.</p>	
	Gelose BLSE	Sólido	<p>Isolar Enterobactérias produtoras de Beta-lactamase de espectro alargado (BLSE) e de bacilos Gram-negativos multirresistentes (119). 2 geloses seletivas permitem detetar as resistências à Cefotaxima (metade da placa de cor azul-esverdeado) e à Ceftazimidina (metade da placa de cor violeta), aumentando a sensibilidade do teste(119). Controlo de qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivos – <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603 (colónias amarelas na metade do meio com cefotaxima e colónias vermelhas na metade do meio com ceftazidima), incubação 24 horas;</li> <li>• Negativos – <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 (inibição), incubação 24 horas (119).</li> </ul>	
	Löwenstein-Jesen	Sólido	<p>Isolar micobactérias (120). Contém verde de malaquite e sais minerais, que inibem o crescimento da maioria dos microrganismos contaminantes. As micobactérias crescem através dos nutrientes presentes no meio como ovo (120). Controlo de qualidade: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37RV – CIP 64.31 e <i>Mycobacterium aurum</i>, incubação 28 dias (120)</p>	
	Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC2)	Sólido	<p>Isolar leveduras e bolores a partir de amostras polimicrobianas (121). Contém uma elevada concentração de nutrientes através das peptonas e glucose, favorecendo o crescimento de fungos(121). Contém gentamicina e cloranfenicol que inibem o crescimento da maioria das bactérias Controlo de qualidade: <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231, incubação 24 horas (121).</p>	

	Todd Hewitt com colistina e ácido nalidixico	Líquido	<p>Isolar <i>Streptococcus</i> do Grupo B (GBS) (122)</p> <p>Peptonas, infusão de coração e extrato de levedura fornecem compostos nitrogenados e vitaminas essenciais para o crescimento bacteriano. A dextrose é uma fonte de carbono e energia. O cloreto de sódio fornece eletrólitos essenciais e mantém o equilíbrio osmótico. O fosfato dissódico e o carbonato de sódio são tampões que neutralizam a acidez produzida durante a fermentação da dextrose e protegem a hemolisina da inativação pelo ácido. A colistina e o ácido nalidixico são agentes seletivos que inibem o crescimento de bactérias gram-negativas (122).</p> <p>Controlo de qualidade: <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ (inibição) e <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC® 12386™ (bom crescimento), durante 24 horas (122)</p>	
	Selenito com/sem cistina	Líquido	<p>Enriquecer seletivamente <i>Salmonella</i> e, em menor grau, <i>Shigella sonnei</i> (123)</p> <p>Peptonas de caseína fornecem substâncias nitrogenadas e compostos de carbono necessários para o crescimento bacteriano. A L-cistina é um agente de enriquecimento, que melhora a recuperação de <i>Salmonella</i>. O fosfato de sódio e a lactose mantêm um pH estável e diminui a toxicidade do selenito. As bactérias que reduzem o selenito produzem álcalis e aumentam o pH. O ácido produzido pela fermentação da lactose causa uma diminuição do pH, o que mantém o caldo num pH neutro. Organismos gram-positivos são inibidos pelo selenito de sódio (123)</p> <p>Controlo de qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sem cistina - <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ (inibição), <i>Shigella sonnei</i> ATCC® 9290™ e <i>Salmonella</i> entérica sorovar <i>Typhimurium</i> ATCC® 14028™.</li> <li>Com cistina – <i>Salmonella</i> entérica sorovar <i>Typhimurium</i> ATCC® 14028™ e <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ (inibição) (123)</li> </ul>	
Seletivo Diferencial	CHROMID® Staphylococcus aureus resistentes à metilina SMART (MRSM)	Sólido	<p>Deteção cromogénica de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina (MRSA) em doentes de risco (124)</p> <p>Substratos cromogénicos e antibióticos permitem o crescimento de estafilococos resistentes à metilina (MRSA) incluindo estirpes hetero-resistentes e as variantes mecC, e a deteção direta das estirpes de MRSA pela revelação da atividade enzimática (colónias rosa a vermelho) (124)</p> <p>Nutrientes permitem inibir a maioria das bactérias Gram-negativas e positivas, Gram-positivas não pertencentes ao género <i>Staphylococcus</i>, bem como leveduras e bolores.</p> <p>Controlo de qualidade: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300™ (colónias rosa a vermelho), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213™ (suspensão calibrada com 0,5 McF e diluição em solução salina estéril para isolamento em placa), durante 24 horas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>10<sup>4</sup> UFC: com <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300™ (MRSA);</li> <li>10<sup>5</sup> UFC: com <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213™ (MSSA) (124)</li> </ul>	
	GRANADA™ (GRAN)	Sólido	<p>Identificar estreptococos do grupo B (<i>S. agalactiae</i>), principalmente em grávidas e recém-nascidos (125)</p> <p>Metotrexato, soro de cavalo e amido permitem a produção de pigmentos laranja a vermelho, característicos de estreptococos do grupo B (125)</p> <p>Os antibióticos inibem a maioria das bactérias Gram-negativas e leveduras (125)</p> <p>Controlo de qualidade: <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC® 12386™ (colónias laranjas), <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212™ (colónias brancas) e <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ (inibição), durante 24 horas (125)</p>	

<p>CHROMID® Candida (CAN2)</p>	<p>Sólido</p>	<p>Isolar leveduras, identificar <i>Candida albicans</i> e diferenciar presuntivamente do grupo de espécies composto por <i>C. tropicalis</i>, <i>C. lusitaniae</i> e <i>C. kefyr</i> (126)  A hidrólise específica de um substrato cromogénico de hexosaminidase na presença de um indutor da enzima provoca a coloração azul das colónias de <i>C. albicans</i> (126)  A hidrólise de um segundo substrato permite diferenciar as culturas mistas e orientar a identificação de outras espécies. As colónias que hidrolisam este substrato são cor de rosa (126)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida albicans</i> – colónias azul claro a escuro;</li> <li>• <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida lusitaniae</i> e <i>Candida kefyr</i> – colónias rosa;</li> <li>• Sem valor: colónias brancas creme (126)</li> </ul> <p>Nota: Crescimento de <i>Candida auris</i> com possibilidade de apresentação de colónias cor de rosa ou branco creme (126)  Controlo de qualidade: <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™ (colónias azul) e <i>Candida tropicalis</i> ATCC® 9968™ (colónias rosa), durante 48 horas (126).</p>	
<p>Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE2)</p>	<p>Sólido</p>	<p>Isolar <i>Haemophilus</i> (127).  Fatores X (hemina) e V (NAD) são produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX™ (127).  Seletivo devido à presença de antibióticos e antifúngicos, inibindo a maioria das bactérias Gram-positivas e leveduras (127).  Controlo de qualidade: <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211™ (incubação em atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>) e <i>Candida albicans</i> ATCC® 60193™, durante 24 e 48 horas, respetivamente (127).</p>	
<p>Columbia + 5% sangue de carneiro suplementado com colimicina e ácido nalidíxico (CNA)</p>	<p>Sólido</p>	<p>Isolar bactérias exigentes Gram-positivas, detetar hemólises (128).  O sangue permite a visualização da hemólise e o ácido nalidíxico e a colimicina inibem as bactérias Gram-negativas e <i>Bacillus</i> (128).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• α – hemólise: coloração esverdeada à volta da colónia;</li> <li>• β – hemólise: coloração clara à volta e em baixo da colónia;</li> <li>• γ – hemólise: sem hemólise (128).</li> </ul> <p>Controlo de qualidade: <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615™ e <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™, durante 24 horas (128).</p>	
<p>Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)</p>	<p>Sólido</p>	<p>Enriquecer, isolar e cultivar espécies de <i>Legionella</i> (129).  A L-cisteína é um aminoácido essencial para o crescimento e o carvão ativado decompõe o peróxido de hidrogénio (produto metabólico tóxico para estas espécies) (129).  (Pode ser um meio não seletivo, que contribui para o crescimento de organismos fastidiosos como <i>Nocardia</i> e <i>Francisella</i>) (129).</p>	
<p>Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC2)</p>	<p>Sólido</p>	<p>Isolar leveduras e bolores (130).  As peptonas e dextrose favorecem o crescimento de estirpes fúngicas, a gentamicina inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e positivas, o cloranfenicol melhora a seletividade (130).  Controlo de qualidade: <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™ e <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™, durante 3 dias (130).</p>	

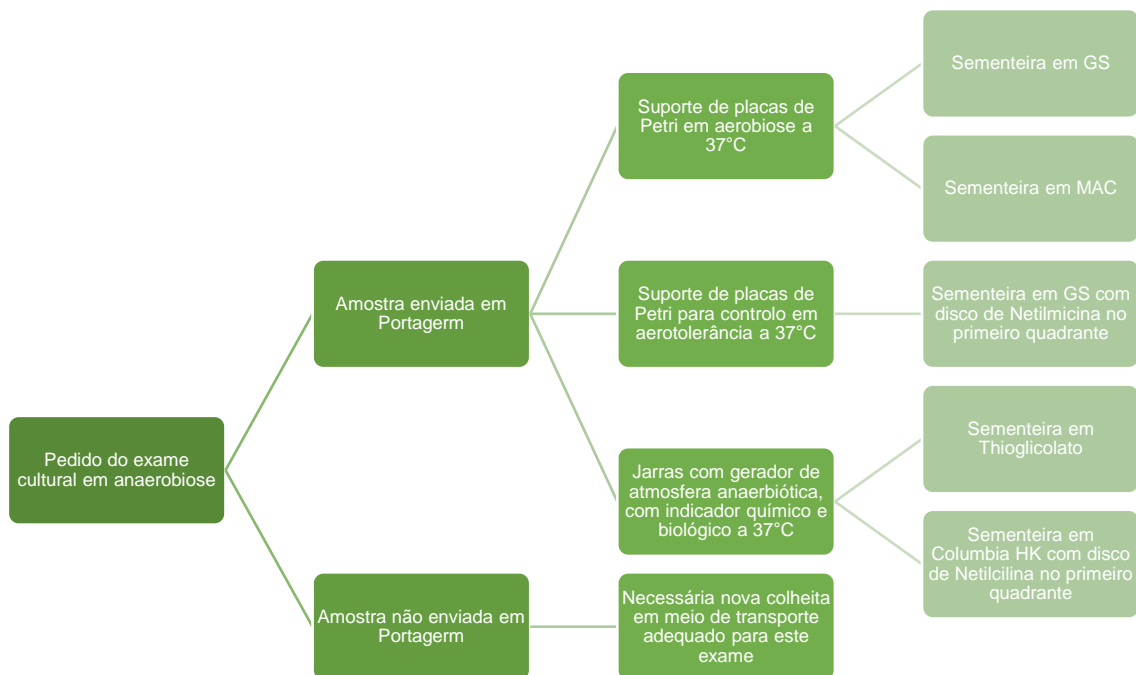
	Base de Agar Legionella CYE		<p>Isolar Legionellaceae (131). Controlo de qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo – <i>Legionella pneumophila</i> ATCC® 33152 (colónias cinzentas/brancas) e <i>Legionella pneumophila</i> NCTC 12821 (colónias cinzentas/brancas);</li> <li>• Negativo – <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228 (inibida) (131).</li> </ul>	
	MacConkey (MAC)	Sólido	<p>Isolar bactérias Gram-negativas (<i>Enterobacteriaceae</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., entre outros) e diferenciar espécies fermentadoras de lactose:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colónias positivas para lactose (diminuição de pH) - cor-de-rosa a vermelho, por vezes rodeadas por um halo de sais biliares precipitados.</li> <li>• Colónias negativas para lactose: incolores ou ligeiramente beges (132).</li> </ul> <p>O cristal violeta deteta a fermentação de lactose através da alteração de cor de vermelho neutro. Este e sais biliares inibem a maioria das bactérias Gram-positivas (132). Controlo de qualidade: <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ (colónias rosa) e <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 14028™ (colónias incolores), durante 24 horas (132).</p>	
	Hektoen (HEKT)	Sólido	<p>Isolar e diferenciar as espécies de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> em amostra de fezes. Sais biliares e corantes inibem bactérias gram-positivas (133). Os microrganismos que fermentam um dos três açúcares formam colónias de cor amarela ou rosa amarelado, os outros produzem colónias verde a verde azulado. Os microrganismos produtores de H<sub>2</sub>S formam colónias com um centro preto (133). A presença de colónias verdes a verde azulado com ou sem um centro preto é uma indicação altamente presumível de <i>Salmonella</i> ou <i>Shigella</i> (133).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Salmonella</i> – Colónias verdes a verde azulado, com ou sem um centro preto;</li> <li>• <i>Shigella</i> - Colónias verdes a verde azulado sem um centro preto; (133).</li> </ul> <p>Controlo de qualidade: <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 14028™ (colónias verdes com centro preto) e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212™, durante 24 horas (133).</p>	
Transporte	Portagerm	Sólido	<p>Manter a viabilidade de organismos aeróbios e anaeróbios. Inibe a difusão de oxigénio presente quando se coloca a amostra e os agentes redutores no meio combinam-se com o oxigénio livre, mantendo a atmosfera de anaerobiose, incluindo um indicador (azul – presença de oxigénio, incolor – ausência de oxigénio)(134).</p>	
	Stuart	Semi-sólido	<p>Manter os microrganismos viáveis durante o transporte de amostras biológicas, através da hidratação da amostra, equilibrando o efeito osmótico a um pH ideal. Este meio não tem nutrientes, logo, os microrganismos não se multiplicam (29). Permite a preservação de organismos fastidiosos como a <i>Neisseria meningitidis</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>Bordetella pertussis</i>, entre outros(29).</p>	

	Amies com carvão	Semi-sólido	Manter os microrganismos viáveis durante o transporte de amostras biológicas, através da hidratação da amostra, equilibrando o efeito osmótico a um pH ideal. Este meio não tem nutrientes, logo, os microrganismos não se multiplicam <sup>30</sup> . Permite a preservação de organismos anaeróbios e extremamente fastidiosos como de <i>Neisseria</i> spp. já que a presença de carvão ativado neutraliza as toxinas e antimicrobianos presentes na amostra colhida(29,135).	
	Cary-Blair	Semi-sólido	Manter os microrganismos viáveis durante o transporte de amostras biológicas, através da hidratação da amostra, equilibrando o efeito osmótico a um pH ideal. Este meio não tem nutrientes, logo, os microrganismos não se multiplicam <sup>30</sup> . Permite a preservação de organismos patogênicos intestinais, lábeis e anaeróbios, como <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Campylobacter</i> spp e alguns anaeróbios <sup>30</sup> .	
	ETM	Líquido	Previne o crescimento excessivo de <i>Enterobacteriaceae</i> , preserva a longo prazo a <i>Shigella</i> e <i>Salmonella</i> , suporta a estabilização e o transporte de <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Yersinia</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. e <i>E.coli</i> (melhora a recuperação da toxina <i>C.difficile</i> e patógenos bacterianos entéricos)(136).	
	PROTO-FIX	Líquido	Fixa os parasitas de forma a demonstrar a morfologia igual ou melhor do que os fixadores com mercúrio, evitando assim, o uso de metais pesados que teriam um impacto ambiental(137). Permite a coloração permanente de uma amostra concentrada sem perda de trofozoítos (137).	
	Meio de Transporte Viral	Líquido	Inativa o vírus na amostra e corta a fonte de infecção de modo a garantir segurança e inibe a atividade DNase/RNase, estabilizando o transporte e armazenando à temperatura ambiente(138).	
TSA	Mueller Hinton E (MHE)	Sólido	Realizar antibiogramas por difusão e determinação de CMI, utilizando o método em disco e por tiras Etest®, de acordo com a EUCAST e CLSI (139). Permite o crescimento de bactérias não exigentes (Enterobacterales, Bacilos Gram-negativos não fermentadores, Staphylococci e Enterococci) (139). O baixo teor de timina (inibidores de sulfonamida) diminui o crescimento à volta dos discos, permitindo uma maior exatidão das zonas de inibição (139). As medições da zona de inibição definem a sensibilidade da estirpe a cada um dos antibióticos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensível;</li> <li>• Resistente (139).</li> </ul> Controlo de qualidade: <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™ (ampicilina e gentamicina) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™ (cipofloxacina, imipeneme e tobramicina) (139).	

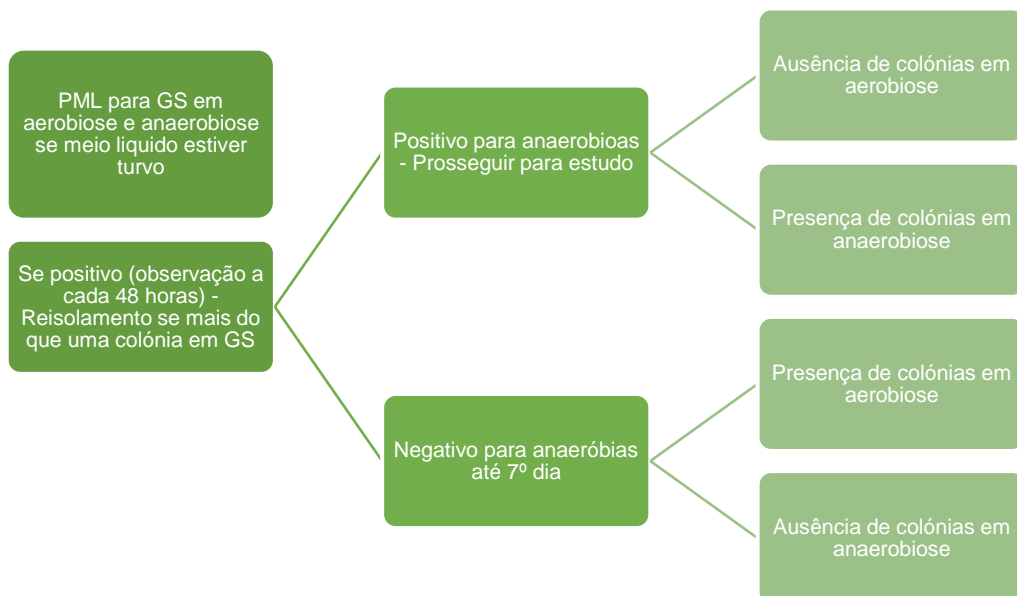
	Cariótipo (RPMI)	Sólido	<p>Aplicar em testes de sensibilidade aos antifúngicos, leveduras e bolores pelo método Etest® (140).</p> <p>MOPS reforça o crescimento das leveduras e bolores (140).</p> <p>Algumas estirpes de <i>Candida albicans</i> podem apresentar sinais de resistência em elipse com os azóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol). Se forem observados tais perfis, é necessário confirmar os resultados com outro método (140).</p> <p>Controlo de qualidade: <i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019™ (cetoconazol, snfotericina B e Fluconazol com bom crescimento) (140).</p>	
--	------------------	--------	--	---

## **Apêndice 2 – Procedimento para pesquisa de microrganismos anaeróbios**

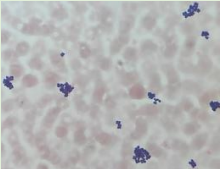


Fase inicial do processo da pesquisa de microrganismos anaeróbicos:




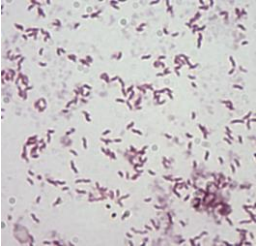
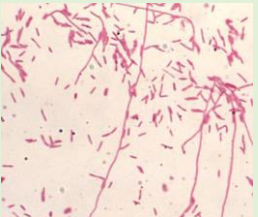
Fase após evidência da presença de microrganismos anaeróbicos:



## **Apêndice 3 - Características das bactérias patogênicas**

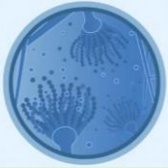

Organismo	Biologia	Epidemiologia	Doença	Diagnóstico
<b><i>Staphylococcus</i></b> 	Catalase (+) Coagulase (-) ou (+) no caso de <i>Staphylococcus aureus</i> Gram (+) Cocos em cacho	Flora microbiana: pele e superfícies mucosas Resistentes a superfícies secas durante longos períodos de tempo Transmissão por contacto direto ou exposição a objetos contaminados Fatores de risco ( <i>S. aureus</i> ): presença de corpos estranho, procedimentos cirurgicos e uso de antibioticos	Endocardite suaguda, infeções de corpos estranhos e do trato urinário <i>S. aureus</i> : Doenças mediadas por toxinas e outras doenças sistemicas	Microscopia (exceto infeções meidadas por toxinas) Exame cultural em meio não seletivo e seletivo TAAN Testes bioquimicos
<b><i>Streptococcus</i></b> 	Gram (+) Cocos em cadeia	Colonização no trato respiratório superior, na superfície da pele e no trato urinário Transmissão por gotículas ou feridas na pele	Doenças supurativas, não supurativas, doença neonatal (grupo B)	Microscopia (exceto faringite e complicações não supurativas) TIC Cultura em meio seletivo (grupo B)
<b><i>Bacillus</i></b> 	Formador de esporos Gram (+) Bastonetes Não-hemolitico ( <i>B. anthracis</i> )	Presente nos solos contaminando alimentos	Doenças cutaneas (humano de forma acidental), oculares, gastroentrites (herbivoros) e inalação (bioterrorismo)	Microscopia Exame cultural
<b><i>Neisseria</i></b>	Oxidase (+) Catalase (+) Gram (-)	Mais prevalente em mulheres e transmissão por contato sexual ( <i>N. gonorrhoeae</i> )	Gonorreia ( <i>N. gonorrhoeae</i> ) Meningite ( <i>N. meningitidis</i> )	Coloração de Gram TAAN



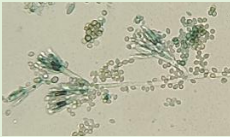
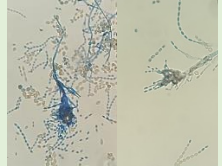

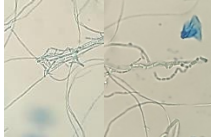
	Crescimento fastidioso (melhor em ambiente húmido a 35-37°C com CO <sub>2</sub> )	Disseminação por secreções de aerossóis e ocorre durante todo o mundo principalmente nos meses secos e frios ( <i>N. meningitidis</i> )		
<b><i>Haemophilus</i></b> 	Bastonetes ou cocobacilos Fermentativos Anaeróbios facultativos	Causadas pela flora orofaríngea (infecção endógena) exceto a infecção causada por <i>H. ducreyi</i> que é transmitida por contato sexual	Meningite pediátrica, artrites, otites, sinusites e infecções do trato respiratório inferior ( <i>H. influenzae</i> ) Conjuntivites ( <i>H. aegyptius</i> )	Microscopia Exame cultural em meio Chocolate TIC ( <i>H. influenzae</i> )
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b> 	Oxidase (-) Gram (-) Anaeróbios facultativos Bastonetes Fermentador	Bastonetes Gram (-) aeróbicos são mais comuns no trato gastrointestinal A maioria das infecções é endógena ( <i>E. coli</i> ) Contaminação de alimentos e disseminação feco-oral direta em crianças ( <i>Salmonella</i> ). Ocorrem durante todo o ano principalmente em meses quentes	A doença extraintestinal inclui bacteremia, meningite neonatal, infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais ( <i>E. coli</i> ) Enterite, febre entérica, bacteremia ( <i>Salmonella</i> )	Exame cultural em meio seletivo
<b><i>Pseudomonas</i></b>	Gram (-) Aeróbios Bastonetes Oxidante da glucose	Presente na natureza em locais húmidos Pode colonizar transitoriamente o sistema respiratório e trato gastrointestinal de doentes hospitalizados	Infecções do trato respiratório, trato urinário, pele e tecidos moles, ouvidos, olhos, bacteremia e endocardite	Exame cultural (identificável pelas características das colónias) Testes bioquímicos

	Necessidades nutricionais simples			
<b>Campylobacter</b> 	Gram (-) Bastonetes finos e curvos	Infeções adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados  Infeção em todo o mundo durante todo o ano	Enterite aguda com diarreia, mal-estar, febre e dor abdominal  Infeção autolimitada, mas pode persistir durante uma semana ou mais	Microscopia TAAN Exame cultural em meios especializados com pouco oxigênio, grandes quantidades de CO <sub>2</sub> e elevadas temperaturas durante 2 ou mais dias  TIC
<b>Legionella</b> 	Gram (-) Não fermentativo Bastonetes delgados pleomorficos Não cora com corantes comuns	Infeções esporádicas, epidemicas e nosocomiais  Encontrado comumente em torres de refrigeração, condensadores e sistemas de água (sistemas hospitalares inclusive)	Doenças legionária e febre de Pontiac	Testes de pesquisa de antígeno de <i>L. pneumophila</i> do serogrupo 1  Exame cultural em meio especializado  TAAN
<b>Clostridium</b>	Formador de esporos Gram (+) Anaeróbicos Bastonetes	<i>C. difficile</i> : Coloniza intestinos através de infecção endogena (exposição a antibióticos) ou infecção exogena  <i>C. perfringens</i> : Presente nos solos, águas e trato intestinal humano e animal	Diarreia associada a antibióticos ( <i>C. difficile</i> )  Intoxicação alimentar associada a carnes e infecções de tecidos moles devido a	Testes de detecção de toxinas (TIC)  Coloração de Gram


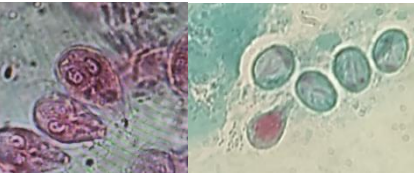
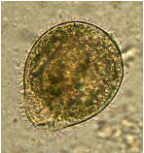
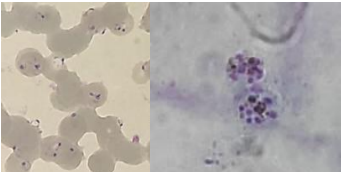
	<p>Produz 2 toxinas</p> <p>Resistente a antibióticos</p>		<p>contaminação bacteriana de feridas ou traumas localizados (<i>C. pefringens</i>)</p>	
<b>Bacteroides</b>	<p>Gram (-)</p> <p>Anaeróbicos</p> <p>Bastonetes pleomórficos</p>	<p>Coloniza o trato gastrointestinal de animais e humanos</p> <p>Infeções endogenas</p>	<p>Associado a infeções pleuropulmonares, intra-abdominais, genitais, de pele e tecidos moles por formação de abscesso</p> <p>Bacteremia</p>	<p>Coloração de Gram</p> <p>Exame cultural em condições de incubação anaeróbicas</p> <p>Testes bioquímicos</p> <p>Identificação em espectrometria de massa</p>
<b><i>Chlamydia</i></b>	<p>Gram (-)</p> <p>Bastonetes pequenos</p>	<p>Doenças sexualmente transmitida mais comum</p> <p>Tracoma ocular</p>	<p>Efeitos patológicos do tracoma devido à recorrência de infeções</p>	<p>Exame cultural</p> <p>TAAN</p>


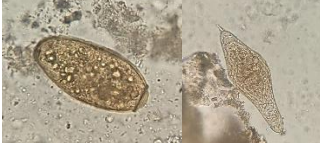

## **Apêndice 4 – Características dos fungos patogênicos**

Microrganismo patogénico	Caracterização macroscópica	Visualização macroscópicas (em meio Sabouraud)	Caracterização microscópica	Visualização em microscópio
<p><b>Aspergillus</b></p> 	<p>Varia com a espécie: <i>A. fumigatus</i>: verde-azulado a cinza; <i>A. flavus</i>: amarelo-esverdeado; <i>A. niger</i>: preto</p>	 <p><i>Aspergillus nidulans</i></p> <p><i>Aspergillus niger</i></p>	<p><b>Características em cultura:</b></p> <p>Varia conforme a espécie, conidióforos com vesículas cobertas com métulas em forma de frasco, e as hifas são hialinas e septadas</p>	 <p><i>Aspergillus nidulans</i></p> <p><i>Aspergillus niger</i></p>
<p><b>Mucormycetes</b></p> 	<p>Colónias de rápido crescimento, com aspeto de lã, de cor cinzento-acastanhado a cinzento-preto</p>	 <p><i>Cunninghamella</i></p> <p><i>Absidia</i></p>	<p><b>Características em cultura:</b></p> <p>Hifas largas, esporângio ou esporangiola produzida a partir dos esporangioforo, rizóide presente em algumas espécies</p>	 <p><i>Cunninghamella</i></p> <p><i>Absidia</i></p>

<p><b>Hialinos</b></p>	<p>Colônias começam por ter uma cor branca e dependendo da espécie e outros fatores podem adquirir cores como verde, cinza ou rosa. Podem ter texturas diferenciadas</p>	 <p><i>Penicillium</i></p>  <p><i>Paecilomyces variotii</i></p>	<p><b>Características em cultura:</b> Conidióforos em forma de pincel. Os conídios podem ser simples, num único ramo, ou podem ter mais do que um ramo.</p>	 <p><i>Penicillium</i></p>  <p><i>Paecilomyces variotii</i></p>
<p><b>Demáceos ou Fungos Negros</b></p>	<p>Colônias de crescimento rápido, com aspeto de lã, de cor preta, cinzenta ou castanha</p>	 <p><i>Neoscytalidium dimidiatum</i></p>	<p><b>Características em cultura:</b> Varia conforme o género e espécie Hifas são pigmentadas, conídios podem ser simples ou em corrente, liso ou áspero e demáceo</p>	 <p><i>Neoscytalidium dimidiatum</i></p>

## **Apêndice 5 – Características dos parasitas patogênicos**


Microrganismo patogénico	Morfologia	Reprodução	Locomoção	Visualização em microscópio
<b>Protozoários</b>				
<b>Amebas</b>	Unicelular Formas de cistos e trofozoítos	Fissão binária	Pseudópodes	 <p><i>Entamoeba</i></p>
<b>Flagelados</b>	Unicelular Formas de cistos e trofozoítos Possivelmente intracelular	Fissão binária	Flagelos	 <p><i>Giardia lamblia</i> (trofozoítos e quistos)</p>
<b>Ciliados</b>	Unicelular Formas de cistos e trofozoítos	Fissão binária ou conjugação	Cílios	 <p><i>Balantidium coli</i></p>
<b>Coccídeos ou Esporozoários</b>	Unicelular Frequentemente intracelular Formas de esporozoítos, cistos (oocisto), trofozoítos e gametas	Esquizogonia e esporogonia	-	 <p><i>Plasmodium falciparum</i> (gota espessa) e <i>Plasmodium vivax</i> (esfregaço de sangue periférico)</p>

Metazoários (Helmintas)				
<b>Nematelmintas</b>	<p>Multicelular</p> <p>Trato alimentar redondo, liso, fusiforme, tubular</p> <p>Possíveis dentes ou placas de fixação</p>	Sexos separados	<p>Ausência de um único organelo</p> <p>Motilidade muscular ativa</p>	 <p><i>Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Enterobius vermicularis</i> (quisto e verme)</p>
<b>Platelmintas</b>  <b>Trematodes</b>	<p>Multicelular</p> <p>Ventosas para fixação</p> <p>Trato alimentar cego</p>	Hermafrodita ( <i>Schistosoma</i> tem sexos separados)	<p>Ausência de um único organelo</p> <p>Motilidade dirigida ao musculo</p>	 <p><i>Paragonimus, Schistosoma intercalatum</i></p>
<b>Céstodes</b>	<p>Multicelular</p> <p>Cabeça com corpo segmentado (proglótides)</p> <p>Ausência de trato alimentar</p> <p>Ventosas e/ou ganchos para fixação</p>	Hermafrodita	<p>Ausência de um único organelo</p> <p>Normalmente aderido à mucosa</p> <p>Possível motilidade muscular (proglótides)</p>	 <p><i>Hymenolepis nana, Taenia solium, Diphyllbothrium latum</i></p>

## **Apêndice 6 – Teste *Mycoplasma* IST 2**

**Mycoplasma IST 2**, para identificação e determinação da suscetibilidade aos fármacos de *Ureaplasma* spp. e de *Mycoplasma hominis*.

O dispositivo contém uma cultura seletiva numa galeria com 22 testes com 3 antibióticos e 1 antifúngico para evitar contaminantes da flora, que permite o crescimento dos micoplasmas. Os substratos específicos presentes (ureia para *Ureaplasma* e arginina para *Mycoplasma*) e o indicador (vermelho fenol) permitem a alteração da cor do meio em caso de cultura positiva, devido à sua ligação com o aumento do pH.



Negativo – Ausência de *Ureaplasma* spp. e *M. hominis*


Positivo – Presença de *Ureaplasma* spp.

Positivo – Presença de *M. hominis*

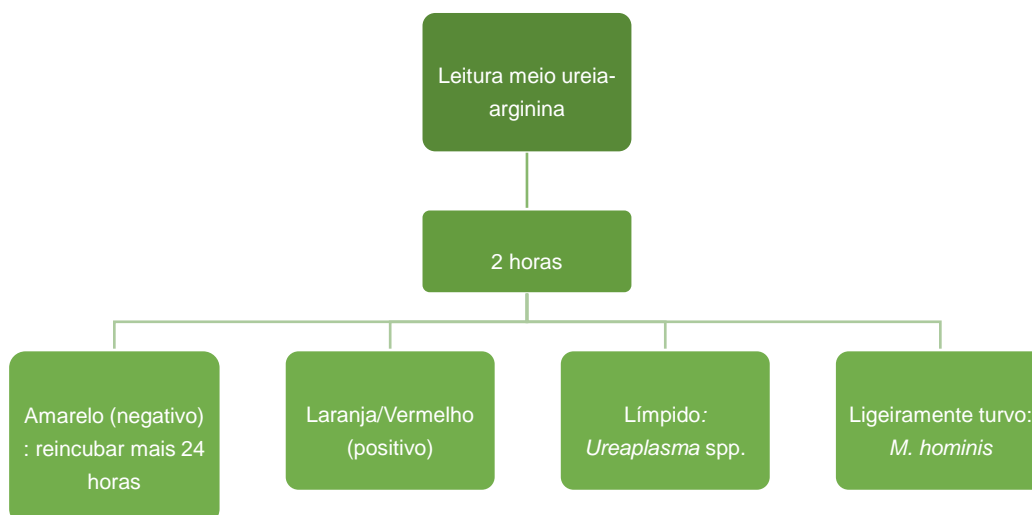
Positivo – Presença de *Ureaplasma* spp. e/ou *M. hominis*

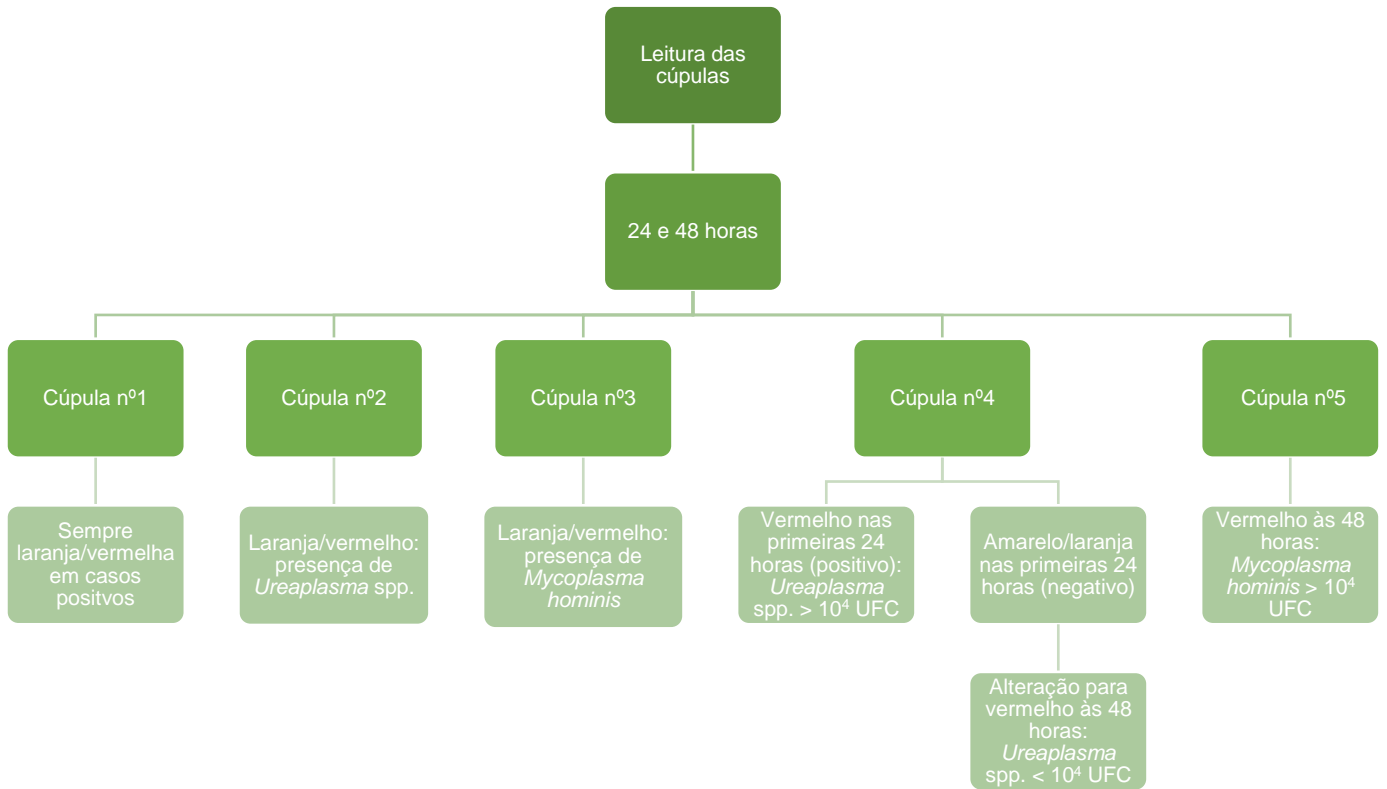
Cúpula	Identificação			Contagem		Testes de sensibilidade (mg/l)																
	0 (Controlo)	Uu	Mh	Uu $\geq 10^4$	Mh $\geq 10^4$	DOT	JOS	OFL	ERY	TET	CIP	AZI	CLA	PRI								
						4	8	2	8	1	4	1	4	4	8	1	2	0,12	4	1	4	
Leitura positiva	Laranja a vermelho			Vermelho		Laranja a vermelho											Laranja a vermelho					
Leitura negativa	Amarelo *			amarelo a laranja		Amarelo											Amarelo					
Interpretação da positividade	Presença de Uu e/ou Mh			Uu $\geq 10^4$ UFC/ coleta	Mh $\geq 10^4$ UFC/ coleta	A estirpe/cepa é: -- Sensível (S) + - Intermédia (I) + + Resistente (R)											A estirpe/cepa é: - Sensível (S) + Resistente (R)					

\* Se a leitura do controlo for (-), não ler as outras cúpulas



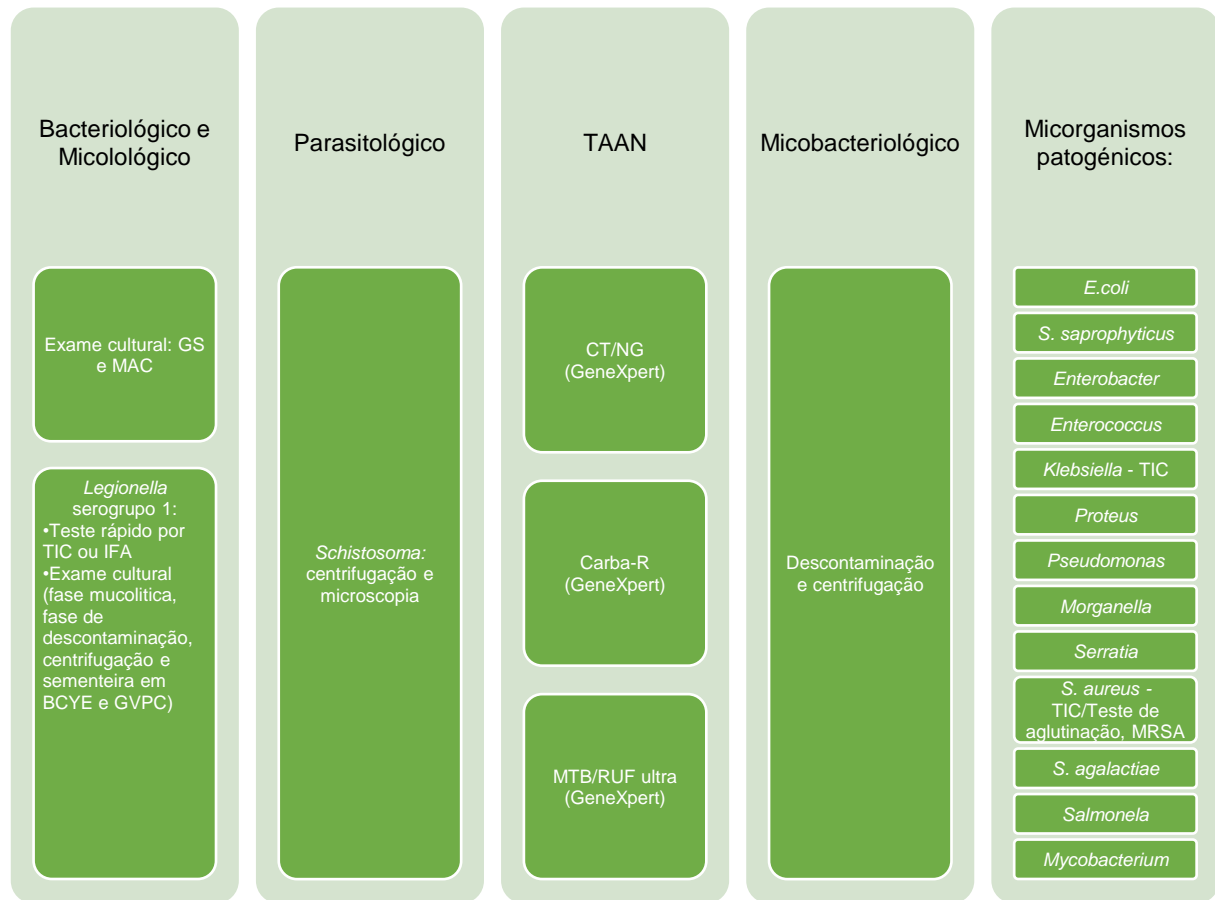
Abaixo podem ser observadas as condições de leitura e interpretação do teste *Mycoplasma* IST 2.



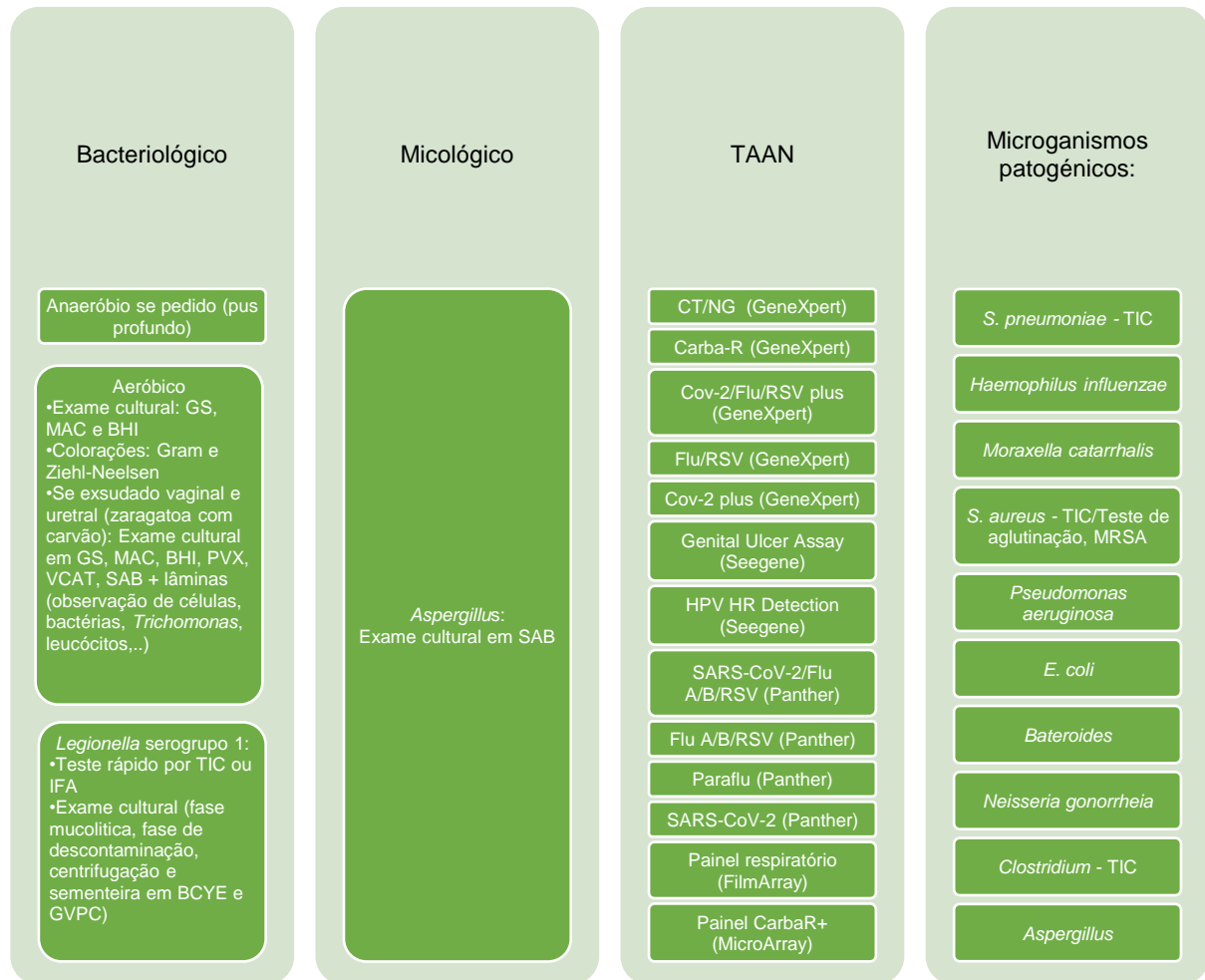


**Apêndice 7 - Testes de diagnóstico microbiológico nas diferentes amostras e os principais microrganismos patogênicos em pesquisa**

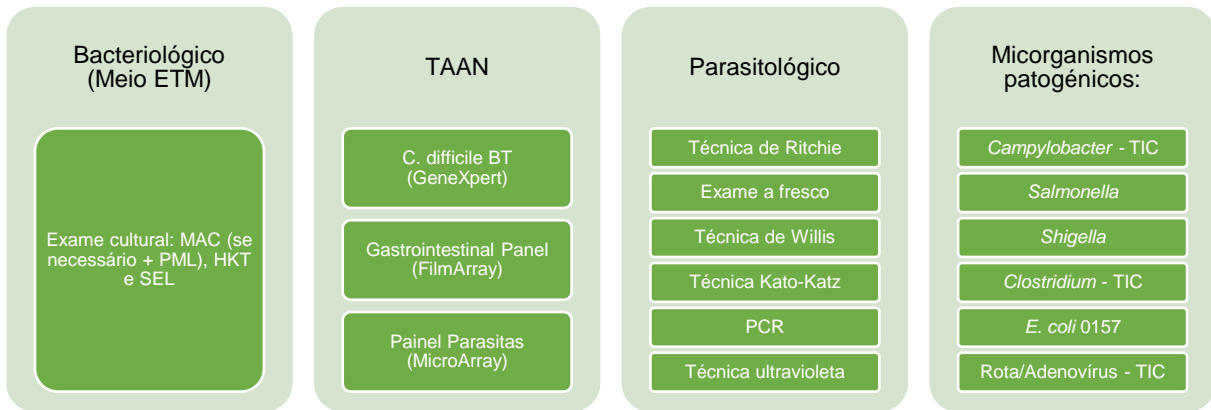
## Urina:



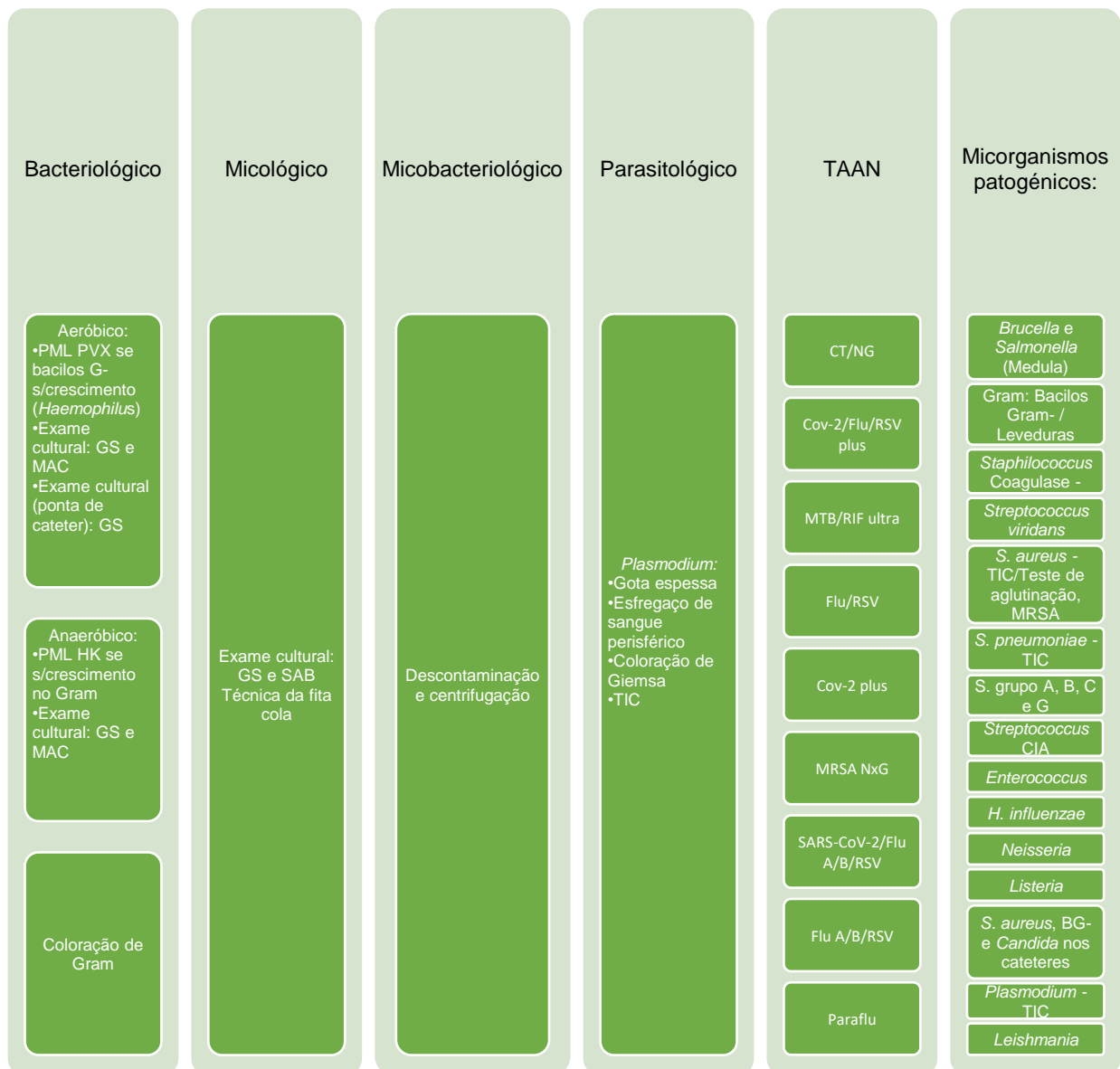
## Exsudados:



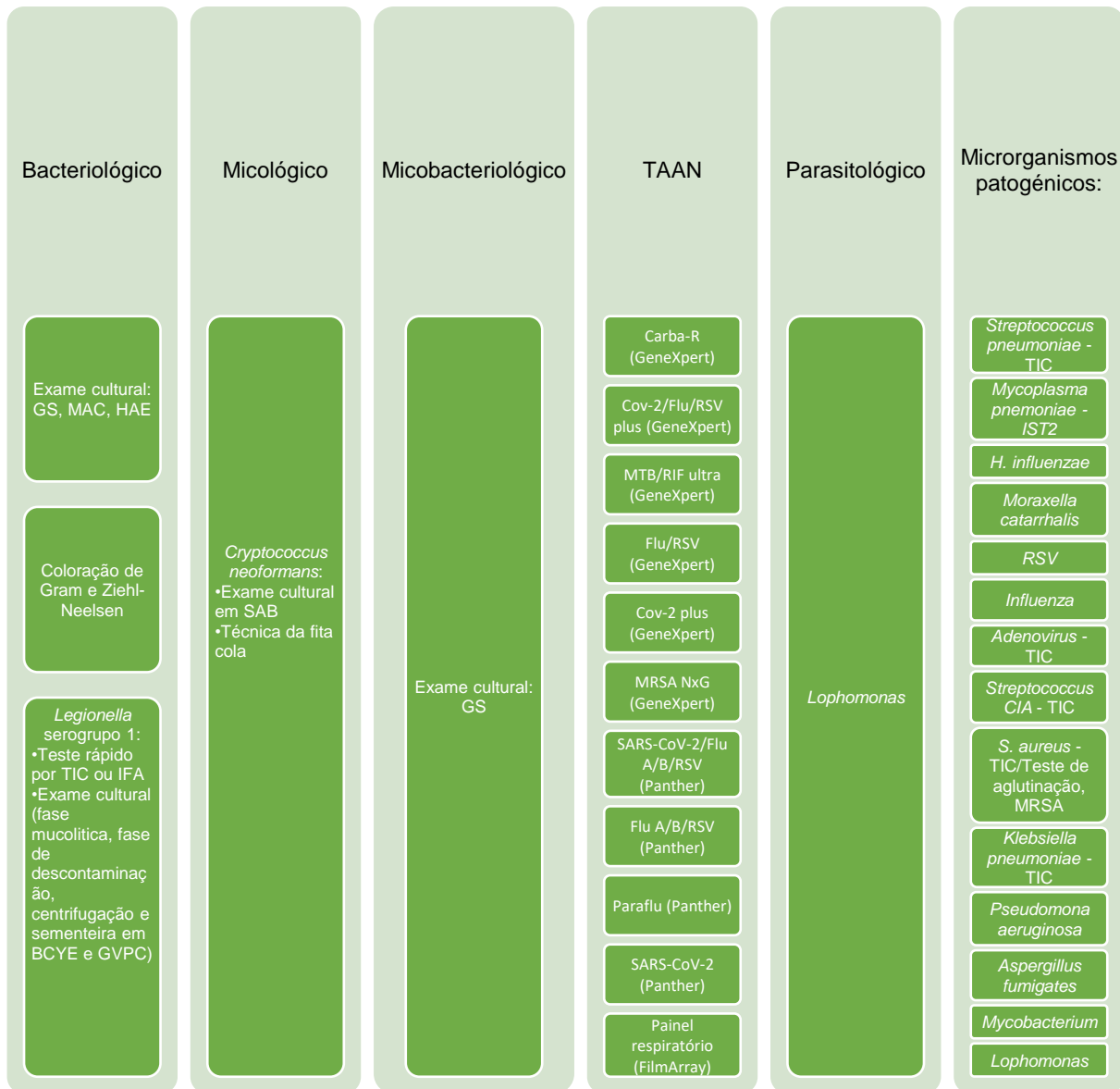
## Fezes:



## Sangue e Medula:



## Trato Respiratório:



## Amostras normalmente estéreis:

