

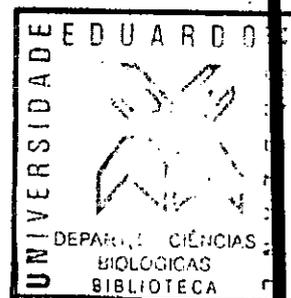
BLO 87



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**Trabalho de Culminação de Curso  
(ESTÁGIO)**

**TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**



**Autor: Leonel Govindo Sempre Monteiro.**



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Trabalho de Culminação de Curso**  
**(ESTÁGIO)**

**TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE**  
**BACTÉRIAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

**AUTOR:**

Leonel Govindo Sempre Monteiro.

**SUPERVISORES:**

Professora Doutora Elena Folgosa.

dr. Arlindo Chaúque.

**ORIENTADORES:**

dr<sup>a</sup>. Alice Manjate.

dr<sup>a</sup>. Josefa Melo.

Samuel Simbine.

Ventura Relvas.

Maputo, Novembro de 2006.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus supervisores Professora Doutora Elena Folgosa e dr. Arlindo Chaúque, pelo acompanhamento. Com os seus múltiplos conselhos, inúmeros e relevantes comentários, desempenharam um papel orientador muito apreciado na construção deste trabalho.

Aos meus orientadores de estágio dr<sup>a</sup> Alice Manjate, dr<sup>a</sup> Josefa Melo, Samuel Simbine e Ventura Relvas, pela orientação técnica, e pelos seus pertinentes comentários, que foram úteis na construção deste trabalho.

A todo pessoal do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

A todos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas.

Aos meus colegas e amigos em especial: Feliciano Chamo Jr., Jonasse Carlos, Neto Fazenda, Ângelo Augusto, João Mabunda, José Langa, Nédio Mabunda, Jerónimo Langa, Nádia Siteo, Milú Munguambe, Eunice Leong, Assa Cuamba, Adelina, Mariana da Silva, Mayela, Charlotte, sem ser injusto com os demais. Foram momentos difíceis superados graças à nossa união.

À minha família; podendo especialmente mencionar os meus incansáveis pais: Margarida e Govindo; irmãos Sílvia, José Manuel, Monteiro, Paulo, Goethe, Marcito, Genilda; primos Lourenço, Edson, Herivelto, pelo encorajamento, apoio moral e financeiro.

À Deus.

Cumpre-me enfim agradecer a todos quanto mercê do seu contributo, possibilitaram a realização deste trabalho.

## DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra que as técnicas apresentadas neste trabalho são executadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane para diagnóstico de doenças bacterianas e que os resultados são verdadeiros.

Leonel Govindo Sempre Monteiro  
(Leonel Govindo Sempre Monteiro).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família e a todos que sempre acreditaram em mim, podendo em especial devotar aos meus queridos pais, irmãos, sem esquecer do meu querido filho Govindo de Leonel Monteiro, razão de minha luta.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APA – Água Peptonada Alcalina.

DAEC – *Escherichia coli* difusamente aderente.

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa.

EHEC – *Escherichia coli* entero-hemorrágica.

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva.

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica.

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica.

KIA – Kligler Iron Agar.

LM – Laboratório de Microbiologia.

MSA – Mannitol Salt Agar.

OMS – Organização Mundial de Saúde

SIM – Motility Sulfide Medium.

SS – Salmonella-Shigella.

TCBS – Tiosulfato – Citrato – Bilis – Sacarose

TM – Thayer-Martin.

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antibióticos.

XLD – Xilose Lisina Desoxicolato.

## RESUMO

O presente relatório de estágio focaliza **Técnicas Laboratoriais para Identificação de Bactérias em Amostras Biológicas**. O principal objectivo do estágio foi a aquisição de conhecimentos, compreensão e execução das principais técnicas de identificação de bactérias usadas no **Laboratório de Microbiologia** da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane.

O trabalho de estágio foi efectivado na unidade supracitada e dividiu-se em duas fases. A primeira estendeu-se de Março a Maio de 2006 tendo consistido basicamente em adaptação à unidade de estágio e elaboração do protocolo. A segunda fase foi de Julho a Outubro de 2006 e consistiu essencialmente no processamento microbiológico de amostras biológicas provenientes de diferentes Hospitais e Centros de Saúde, bem como de Clínicas da cidade de Maputo. O processamento, incluiu a inoculação de amostras em meios de cultura apropriados, o isolamento das colónias bacterianas suspeitas (sugestivas de um patógeno), a identificação das estirpes isoladas, e o teste de sensibilidade aos antibióticos.

Durante a segunda fase do estágio foram recebidas um total de 234 amostras das quais: 26 de urina, 150 de fezes, 23 de secreções purulentas, 6 de exsudatos vaginais e 5 de zaragatoa uretral, 18 de expectoração, 4 de secreção ocular, 1 de exsudato faríngeo e 1 de líquido pleural. Foram identificadas com maior frequência: *Staphylococcus aureus* (70,6%) em amostras de pús (secreções purulentas), e *Escherichia coli* (38,5%) em amostras de urina. Não foi possível isolar bactérias nas seguintes amostras: fezes, exsudatos vaginais e uretrais, expectoração, exsudato faríngeo e líquido pleural. As técnicas frequentemente usadas para identificação das estirpes isoladas consistiram na avaliação da actividade metabólica das bactérias em relação a certas substâncias orgânicas.

Durante o estágio verificou-se que as técnicas de identificação de bactérias desempenham um papel fundamental no auxílio do Clínico para a prescrição do antibacteriano apropriado.

## ÍNDICE

1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	1
1.1. BREVE HISTORIAL DO LOCAL DE ESTÁGIO .....	2
2. PROGRAMA DO ESTÁGIO .....	4
3. OBJECTIVOS.....	5
3.1. GERAL.....	5
3.2. ESPECÍFICOS.....	5
4. APOIO CONCEDIDO AO ESTUDANTE POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO .....	6
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
6. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	19
6.1. MATERIAL .....	19
6.2. METODOLOGIA DE TRABALHO .....	19
6.3. OUTRAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	31
6.4. RESULTADOS / DISCUSSÃO.....	33
7. PERSPECTIVA CRÍTICA DOS PROCESSOS DE TRABALHO DA UNIDADE DE ESTÁGIO .....	37
8. CONCLUSÕES .....	38
9. RECOMENDAÇÕES.....	39
10. BIBLIOGRAFIA .....	40
ANEXOS 1,2,3.	

## 1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O trabalho de estágio foi efectivado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane. Localizado na Avenida Salvador Allende nº 702, CP 257, na cidade de Maputo. Este laboratório faz parte do departamento académico de Microbiologia e se divide em diversos sectores para uma boa coordenação e execução das tarefas como ilustra a figura 1.

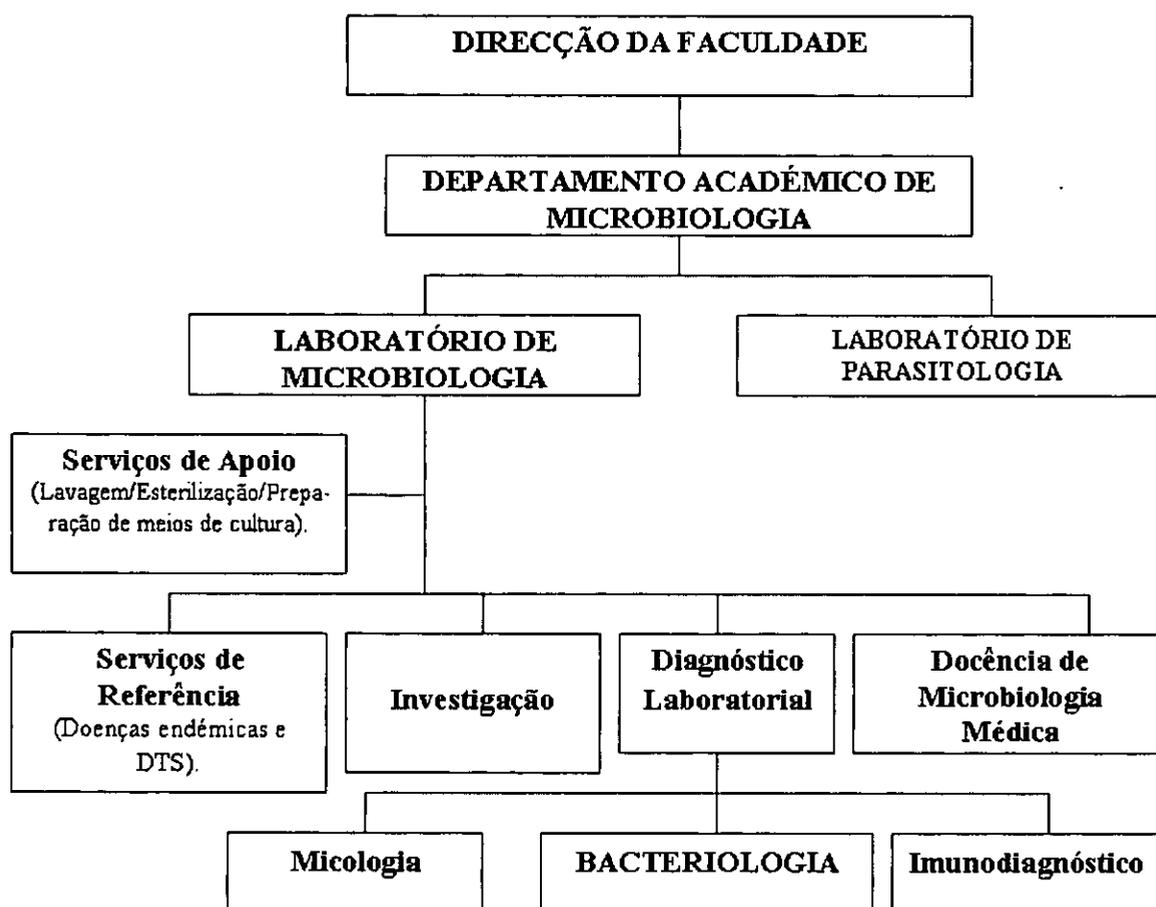


Figura 1. Organograma da unidade de estágio.

### **1.1. Breve historial do local de estágio**

O laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina faz parte do Departamento Académico de Microbiologia que tem a seu cargo a disciplina de Microbiologia. Para além de suas actividades inerentes ao apoio à docência da disciplina de Microbiologia, este Laboratório, colabora com as autoridades responsáveis pelo controle de epidemias no Ministério da Saúde desde a epidemia da cólera na cidade de Maputo em 1980, permitindo assim, através do bom relacionamento e vocação do Laboratório para esta área e em troca dos bons serviços, contar ao longo destes anos com assistência técnica, dotação de equipamento, material e reagentes ao abrigo de projectos com o Ministério da Saúde (LM, 1999).

Em 1990, melhorou a capacitação técnica e organização estrutural (emergência do Gabinete de Epidemiologia, Endemias e o seu Departamento de Epidemiologia, dotação de quadros superiores ao Laboratório e crescimento do Departamento Académico de Microbiologia) alargando o âmbito, frequência e nalguns casos, a regularidade destas actividades (LM, 1999).

Foi assim que em 1997 celebrou-se entre a Direcção de Assistência Médica do Ministério da Saúde e a Direcção da Faculdade de Medicina um acordo de cujo âmbito foi o reconhecimento do Laboratório de Microbiologia do Departamento Académico de Microbiologia da Faculdade de Medicina, como Laboratório Nacional de Referência para o diagnóstico de Doenças Infecciosas dentre os Programas Nacionais de Controle de endemias, formando e capacitando nessa área pessoal clínico e outros técnicos de saúde, de modo a que este pudesse prestar os serviços que o Departamento de Epidemiologia e Endemias necessitasse, para que melhor cumprisse as suas finalidades (LM, 1999).

Em Dezembro de 1998, ao fim de longos anos de espera, o pessoal do Laboratório de Microbiologia que até aí vinha desenvolvendo todas as suas actividades num pré-fabricado localizado nas traseiras do edificio da Faculdade (instalações em péssimo estado de manutenção e sem possibilidades de climatização, o que dificultava a manutenção da qualidade dos serviços prestados e a previsão de abertura de novas áreas de investigação e extensão), viu finalmente

concretizada a mudança para novas instalações e a melhoria das suas condições de trabalho (LM, 1999).

Além da docência, e das suas actividades como referência para diagnóstico de doenças infecciosas de etiologia bacteriana e micológica, o Laboratório tem exercido actividades de investigação e extensão. Estas últimas em colaboração com outros Departamentos Clínicos e com a Repartição de Epidemiologia do Ministério da Saúde (LM, 1999).

## 2. PROGRAMA DO ESTÁGIO

O programa de estágio pré-estabelecido (veja tabela 1 do anexo 1), dividiu-se em dois períodos: um período datado de Março a Maio de 2006, que se caracterizou pela adaptação do estagiário sobre os processos de trabalho da unidade de estágio, acompanhamento dos trabalhos executados no sector de trabalho (Bacteriologia), pesquisa bibliográfica concernente à temática do trabalho, e por fim a elaboração do protocolo. O segundo período estendeu-se de Julho a Outubro de 2006 e consistiu principalmente no processamento das amostras com o propósito de identificar bactérias nelas presentes. Assim sendo, para o alcance de seus objectivos o estagiário cumpriu mais de 306 horas previstas, na unidade de estágio.

### 3. OBJECTIVOS

#### 3.1. Geral

- Conhecer, compreender e executar as principais técnicas laboratoriais para identificação de bactérias, usadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

#### 3.2. Específicos

- Compreender e executar os testes para identificação das bactérias antes e após cultura em meios apropriados;
- Compreender, executar e interpretar os resultados do Teste de Sensibilidade aos Antibióticos.

#### **4. APOIO CONCEDIDO AO ESTUDANTE POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO**

Para efectivação do seu trabalho, o estudante contou com a disponibilidade imediata do corpo técnico da unidade de estágio, mais propriamente do sector onde estagiou, para o entendimento, compreensão e execução do seu trabalho, acesso a manuais técnicos especializados na temática do trabalho, impressão de diversos documentos, disponibilidade de materiais para realização do trabalho. De salientar o bom ambiente de trabalho proporcionado pelo corpo técnico.

## 5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1. Bactérias

As bactérias fazem parte de um grande e diverso grupo de microorganismos unicelulares, que se multiplicam por fissão binária, um processo no qual a bactéria mãe se divide em duas bactérias idênticas e independentes (Ravel, 1997 e Walters *et al.*, 1997).

#### 5.1.1. Classificação

As bactérias são classificadas pela sua morfologia, reacções de Gram e outros tipos de coloração, necessidades de crescimento e características bioquímicas. Pelo uso de técnicas especializadas, estas podem também ser agrupadas pela composição do DNA. Morfologicamente, as bactérias podem ser: cocos, bacilos e espiroquetas. Muitas espécies bacterianas são capazes de mudar sua forma, especialmente após crescimento em meios artificiais; tais organismos com essa capacidade são chamados de pleimórficos (Ravel, 1997 e Murray *et al.*, 2004).

##### 5.1.1.1. Cocos

São bactérias arredondadas ou ovais medindo cerca de 0,5-1,0µm de diâmetro. Quando se multiplicam, os cocos podem permanecer agrupados em pares, cadeias ou grupos irregulares. Cocos que caracteristicamente se agrupam aos pares são chamados de diplococos, e dentre eles se destacam espécies do grupo meningococo e gonococo. As espécies pertencentes ao género *Streptococcus* possuem uma forma de agrupamento característica em cadeia, como por exemplo *Streptococcus pyogenes*. Os membros do género *Staphylococcus* são caracterizados pelo seu agrupamento irregular (tipo cacho de uva), um exemplo destes é *Staphylococcus aureus*. Geralmente, os estafilococos e estreptococos são Gram positivos, enquanto os diplococos podem ser Gram positivos (exemplo: *Streptococcus pneumoniae*) ou Gram negativos (exemplo: género *Neisseria*) (Jawetz *et al.*, 2000).

### 5.1.1.2. Bacilos

São bactérias em forma de bastonetes com extremidades arredondas, fusiformes ou quadradas. Medem 1-10 µm em comprimento e 0,3-1,0 µm em largura. Bacilos curtos com extremidades arredondadas são chamados de cocobacilos. Quando se multiplicam, usualmente os bacilos têm tendência a separar-se. Todavia, ocasionalmente estes podem formar: cadeias, por exemplo espécies de *Streptobacillus*; cadeias ramificadas, por exemplo *Lactobacillus*; amontoados por exemplo *Mycobacterium leprae*; permanecer fixos a vários ângulos que se assemelham a caracteres chineses por exemplo *Corynebacterium diphtheriae*. Alguns bacilos como os dos géneros *Clostridium* e *Bacillus* são capazes de formar esporos resistentes quando as condições para o desenvolvimento vegetativo são desfavoráveis. Muitos bacilos são móveis através de um ou mais flagelos, numa ou em ambas extremidades ou ainda à volta do organismo inteiro. Muitos bacilos são Gram negativos como a larga família das enterobactérias (Marshall, 1995).

### 5.1.1.3. Espiroquetas

São organismos flexíveis, enrolados e móveis. Eles progridem através de movimentos rápidos. Muitas não são facilmente coradas pelo método de Gram. As espiroquetas dividem-se em três grandes grupos Treponemas, Borrelias e Leptospiras. No grupo de Treponemas, destaca-se o *Treponema pallidum* agente causador da sífilis, uma doença de Transmissão sexual de grande impacto na Saúde Pública (Jawetz *et al.*, 2000).

## 5.1.2. Factores de virulência das bactérias

As bactérias são capazes de atravessar as defesas normais do corpo humano e causar doenças, através da invasão de tecidos por crescimento ou produção de toxinas. Tal invasão é denominada de infecção, e as bactérias capazes de a causar são chamadas de patogénicas. O desenvolvimento de uma infecção depende das complexas interações de susceptibilidade do hospedeiro à infecção, do potencial de virulência da bactéria e da oportunidade de interacção entre o hospedeiro e a bactéria (Murray *et al.*, 2004).

Algumas das vias que auxiliam o estabelecimento dos patógenos nos tecidos, a sua multiplicação e patogenicidade incluem: existência de cápsula, presença de pili, produção de enzimas extracelulares, libertação de endotoxinas e síntese de exotoxinas. Bactérias tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* são capazes de secretar em volta de suas paredes celulares uma cápsula fina protectora, que os previne da destruição por células fagocitárias do hospedeiro, e contribui para virulência da bactéria (Murray *et al.*, 2004).

Estirpes virulentas de organismos como *Neisseria gonorrhoeae* e algumas *Escherichia coli* estão cobertas de pili, que auxiliam a sua adesão a outros organismos e aos tecidos do hospedeiro (Jawetz *et al.*, 2000).

Muitas bactérias produzem enzimas extracelulares que contribuem para a sua patogenicidade. Estas incluem: **Quinases**, que podem ser estreptoquinases produzidas por *Streptococcus* e estafiloquinases produzidas por *Staphylococcus*; **Coagulase**, produzida por *Staphylococcus aureus*; **Hialuronidase**, presentes em *Clostridium perfringens* e alguns *Streptococcus* e *Staphylococcus*; **Beta ( $\beta$ ) -lactamases** produzidas por muitas bactérias incluindo algumas estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae*. Esta enzima é capaz de destruir penicilinas e cefalosporinas, tornando estes antibióticos ineficazes no tratamento das infecções causadas por estas bactérias (Jawetz *et al.*, 2000).

Certos organismos secretam substâncias tóxicas chamadas exotoxinas que são capazes de destruir ou prejudicar as células hospedeiras e tendem a ser específicas na sua acção, por exemplo a exotoxina de *Clostridium tetani* é uma neurotoxina. Outros patógenos importantes produtores de exotoxinas incluem *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Shigella dysenteriae* e *Vibrio cholerae*. A patogenicidade desses organismos é completamente dependente da produção da exotoxina. A toxina produzida pelos patógenos entéricos é chamada enterotoxina. Espécies de *Staphylococcus* e algumas espécies de *Streptococcus* produzem leucocidina que é capaz de destruir os leucócitos (Murray *et al.*, 2004).

A parede celular das bactérias Gram negativas contém endotoxinas. Diferentemente de exotoxinas, endotoxinas não são secretadas por um organismo, mas sim libertadas quando o organismo é destruído; portanto, as endotoxinas não contribuem directamente para a invasão da bactéria (Marshall, 1995).

## 5.2. Amostras

Denomina-se amostra a uma porção do produto ou das secreções exsudativas de uma região anatómica, onde nos interessa determinar a presença de microorganismos (Folgosa e Martelli, 1985).

O diagnóstico preciso e fiável de uma bactéria depende em grande medida de outros factores, à semelhança dos fungos, do cuidado meticuloso e da limpeza que se tem no momento de proceder a colheita da amostra. De pouco valerá a escolha adequada do meio de cultura' óptimo e a correcta aplicação dos métodos e técnicas de investigação complementares, se a amostra não foi obtida com qualidade desejável (Folgosa e Mondlane, 2005).

### 5.2.1. Urina

O exame da urina proporciona ao clínico informações preciosas sobre a patologia renal e do trato urinário, bem como de algumas moléstias extra-renais. Para exame bacteriológico, a amostra deve ser colhida assepticamente, após higiene da região do meato uretral desprezando os primeiros 10 a 20 ml e recolhendo o volume necessário no jacto médio, da primeira micção do dia. Tratando-se de mulheres deve-se seguir o seguinte para obtenção da amostra (Lima *et al.*, 1992):

1. rigorosa limpeza da vulva e da vagina, com água e sabão, seguida de assepsia destas estruturas;
2. afastamento dos grandes lábios;
3. a colheita deve ser de preferência feita por pessoal especializado.

Em crianças de pouca idade, a colheita pode ser feita por meio de colector plástico ou da punção suprapúbica.

### **5.2.2. Fezes**

O material fecal é uma amostra comum e típica para investigação de microorganismos patogénicos no trato intestinal. Este, deve ser examinado o mais cedo possível após a sua emissão, evitando-se contaminação com urina. Quanto mais rápido forem semeadas, mais seguros os resultados. O material deve ser colhido em frascos estéreis, contendo sempre que possível um meio conservador. Quando as fezes contêm muco, uma porção deste deverá ser incluída na amostra. Pode-se também por auxílio de uma zaragatoa colher material directamente do recto, neste caso a amostra deve ser enviada ao laboratório num meio de transporte adequado, caso não seja possível processá-la de imediato (Lima *et al.*, 1992).

### **5.2.3. Secreções e exsudatos**

As amostras de secreções para exame microscópico e cultura incluem material do cérvix, vulva, uretra, conjuntiva, nariz, garganta, boca, exsudato de lesões da pele e úlceras (Folgosa e Mondlane, 2005).

As amostras são obtidas com uma zaragatoa estéril, com a qual se colhe a maior quantidade possível da secreção. Em casos de abscessos de pele ou de feridas e queimaduras, deve-se fazer uma limpeza da pele com água e sabão ou com um desinfectante fraco para evitar a contaminação com microorganismos da periferia que não são patógenos. A zaragatoa é colocada dentro de um tubo ou frasco com meio de transporte adequado. Com outra zaragatoa colhe-se outra amostra e prepara-se um ou mais esfregaços sobre lâminas (Marshall, 1995).

### **5.2.4. Expectoração**

A obtenção da amostra varia com a natureza do processo infeccioso. O doente deve lavar a boca com água estéril ou fervida, e depois expectorar para dentro do recipiente. Recomenda-se a obtenção das amostras pela manhã, altura em que a expectoração é mais concentrada (Folgosa e Mondlane, 2005).

### 5.2.5. Líquidos corporais

A obtenção das amostras de líquidos corporais, que incluem: LCR, líquido ascítico, sinovial ou articular, pleural e pericárdico é da responsabilidade do médico que deverá proceder à sua colheita em condições de rigorosa assepsia (Folgosa e Mondlane, 2005).

### 5.3. Meios de cultura

Um meio de cultura é uma substância usada para cultivar microorganismos no laboratório; os meios para cultivar bactérias são designados de meios bacteriológicos. Estes contêm as necessidades em nutriente, pressão osmótica e pH em quantidades correctas (Walters *et al.*, 1997).

Os tipos mais importantes de meios de cultura são: básicos, enriquecidos, selectivos, diferenciais e de transporte. **Meios básicos**, são meios simples como agar nutritivo e caldo nutritivo que suportam o crescimento de organismos que não têm exigências nutricionais especiais. **Meios enriquecidos**, são meios enriquecidos com sangue inteiro, sangue lisado, soro, peptonas, extractos especiais ou vitaminas para suportar o crescimento de patógenos que requerem nutrientes adicionais ou estimulantes de crescimento (exemplo: água peptonada alcalina (APA)). **Meios selectivos**, são meios que contêm ingredientes que inibem o crescimento de certos microorganismos, enquanto deixam outros se desenvolverem. O uso deste tipo de meios aumenta as chances de recuperar um determinado organismo de uma população variada de bactérias (exemplo: agar TCBS). **Meios diferenciais (indicadores)**, são meios que contêm substâncias que visivelmente mudam, como resultado das actividades metabólicas de um microorganismo particular. Estes podem indicar mudanças químicas, como fermentação de açúcares (exemplo: agar MacConkey). **Meios de transporte**, são na sua maioria semi-sólidos, e contêm ingredientes que previnem o crescimento de organismos comensais e asseguram a sobrevivência de patógenos aeróbios e anaeróbios quando as amostras não podem ser semeadas de imediato (Cheesbrough, 1984).

Dependendo da concentração de agar, os meios podem ser classificados em **sólidos** quando a concentração de agar é maior, **semi-sólidos** apresentam uma pequena concentração de agar e **líquidos** quando não contém agar (Marshall, 1995).

#### **5.4. Inoculação de meios de cultura**

O primeiro passo para investigação de uma amostra é o seu processamento, sendo a primeira etapa a sua inoculação em meios de cultura idóneos. A escolha dos meios de cultura a serem usados é condicionada pelo tipo de exame e, em particular, pelas espécies bacterianas que pretendemos isolar. Somente em raros casos, o exame bacterioscópico directo com prévia coloração, pode fornecer dados suficientes para a identificação presuntiva (ex: Meningococo, Gonococo, Bacilo de Koch, etc.) (Health Protection Agency, 2004a e Folgosa e Martelli, 1985).

Os meios devem ser inoculados numa ordem lógica: 1. meios sem inibidores (ex: agar sangue); 2. meios indicadores (ex: CLED agar); 3. meio selectivo (agar XLD, agar chocolate; 4. esfregaços para coloração. Todavia, podem existir ocasiões em que não é possível inocular meios deste modo. Por exemplo, zaragoas para cultura de gonococos (GC) podem conter somente um número pequeno de organismos. Isto fará com que se torne prioritário inocular em meio selectivo agar GC (Health Protection Agency, 2004a).

Os meios líquidos devem ser inoculados primeiro quando se processam amostras fluídas. Isto reduz as chances de contaminação através de meios sólidos. Porém, meios líquidos devem ser inoculados depois dos meios sólidos quando são examinadas zaragoas e fezes, para evitar a diluição de organismos contidos na amostra e que qualquer organismo não-viável presente no meio líquido seja transferido para outro meio líquido, meio sólido ou para lâminas (Health Protection Agency, 2004a).

Quando se pretende inocular meios de cultura deve ser usada a técnica asséptica com o propósito de prevenir a contaminação das culturas e das amostras, e para prevenir a infecção do trabalhador do laboratório e do ambiente. Antes da inoculação de meios de cultura em placas, a superfície

deve ser seca (normalmente 30-40 minutos a 37 °C é adequado), caso contrário não se formarão colónias individuais. Para inocular, aplica-se o inóculo sobre uma pequena área da placa usando uma ansa estéril ou zaragatoa da amostra; esteriliza-se a ansa e em seguida espalha-se o inóculo sobre a superfície do meio (Health Protection Agency, 2004a).

Para inocular tubos com meios inclinados como Kligler Iron Agar, usa-se uma agulha para puncionar o fundo primeiro e em seguida espalha-se o inóculo em zigue zague sobre a superfície inclinada. Usa-se uma agulha para inocular meios como “Motility Indole Urea” (MIU), através de inoculação no centro do meio, tendo o cuidado de retirar a ansa da linha do inóculo sem fazer novas linhas. A inoculação de meios líquidos é feita usando uma ansa estéril, agulhas, pipetas de Pasteur, dependendo se o inóculo se é de crescimento em meio de cultura sólido, líquido, ou de uma amostra (Cheesbrough, 1984).

Após a inoculação os meios são guardados em estufa termostática à temperatura óptima (geralmente 37°C) por 18-24 horas para permitir o desenvolvimento dos microorganismos eventualmente presentes na amostra (Walters *et al.*, 1997).

### **5.5. Isolamento de colónias**

As culturas só são observadas após 18 a 24 horas da sua inoculação em meios de cultura. O trabalho real da detecção inicia-se quando se estabelece a presença de uma infecção bacteriana. Muitas culturas serão negativas, isto é, não apresentarão bactérias patogénicas (Marshall, 1995).

Em geral pode-se afirmar que as bactérias crescem determinando turvação nos meios líquidos (caldos) e formação de colónias nos meios sólidos. Neste caso, se a carga bacteriana é muito elevada, as colónias confluem determinando um conjunto homogéneo na superfície do meio (“pátina bacteriana”). Neste ponto, baseando-se em algumas *características culturais* orienta-se a pesquisa na direcção mais adequada, para chegar à identificação (Folgososa e Martelli, 1985).

A obtenção de colónias isoladas depende basicamente da inoculação da amostra, sendo que uma boa técnica de sementeira irá proporcionar um crescimento disperso das colónias, permitindo uma boa observação e selecção das mesmas. Os microorganismos que crescem em meios líquidos, devem ser subcultivados em meios sólidos para obtenção de colónias isoladas (Health Protection Agency, 2004a).

## **5.6. Identificação das bactérias**

### **5.6.1. Identificação preliminar**

Ao classificar microorganismos, todas as características conhecidas são levadas em conta, mas certas características são seleccionadas e usadas com a finalidade de identificação. Quando colónias bacterianas de espécies únicas, crescem em meios específicos, sob condições controladas, são descritas pelas suas características, tais como dimensão, forma, consistência e por vezes pigmentos. Quando as condições de crescimento são cuidadosamente controladas, a morfologia das colónias é importante para identificação preliminar e para diferenciação dos organismos (Health Protection Agency 2005a).

Podem ser observadas colónias com várias dimensões: com diâmetro inferior ou igual a 1mm, ou da ordem de poucos milímetros (2, 3, 4 mm) ou colónias que não apresentam limites definidos, mas que se desenvolvem ocupando bastante espaço da superfície disponível. Todavia, as dimensões das colónias não têm valor absoluto, pois colónias da mesma espécie bacteriana podem apresentar dimensões diferentes, dependendo as mesmas do tipo de meio disponível e do tempo de incubação. Além das suas dimensões, as colónias podem caracterizar-se pelas suas margens, nítidas ou entalhadas, pela sua superfície lisa ou rugosa, pelo seu aspecto mucoso (determinado pela presença de cápsula) ou não. Um exemplo de colónias coradas por causa da produção de pigmentos (exemplo *Pseudomonas auriginosa*) (Folgora e Martelli, 1985 e Health Protection Agency, 2005a).

As características culturais, no entanto não chegam por si só para identificar um microorganismo. Para além destas, a identificação primária normalmente envolve alguns testes

simples como a coloração de Gram, os testes da oxidase e catalase. Os resultados destes testes indicam a realização de testes secundários ou até mesmo terciários para confirmar a identidade do caso (Health Protection Agency 2005a).

### 5.6.2. Identificação bioquímica

Embora todas as características morfológicas das culturas, e os resultados dos testes primários de identificação, sejam úteis, não são suficientes para chegar à identidade precisa das espécies bacterianas. Daí, a importância de se recorrer às provas bioquímicas. A escolha destas, deve ser qualitativa, isso significa, chegar à identificação de maneira correcta e no menor tempo possível, e evitar provas inúteis que comportam gastos de tempo e material (Folgosa e Martelli, 1985).

As provas bioquímicas avaliam a actividade metabólica dos microorganismos em relação à certas substâncias orgânicas, tais como açúcares e substâncias azotadas. Em cada procedimento bioquímico, a bactéria desconhecida causará uma alteração do meio ao qual foi adicionada uma substância específica a testar. A modificação poderia ser indicada pela formação de um gás (dióxido de carbono) ou fermentação de carboidratos, como dextrose, sacarose e lactose. Uma alteração na coloração poderia ocorrer no meio como sendo resultante de um indicador de pH, que pode resultar de um ácido que é produzido durante uma reacção de fermentação. Algumas bactérias conseguem fazer uso do aminoácido triptofano para produzir indol, que pode ser observado por meio de uma alteração na cor de um indicador, na presença de indol (Marshall, 1995).

Tradicionalmente, o exame de bactérias através de testes bioquímicos individuais tem sido o método mais comum usado no auxílio à identificação bacteriana. Todavia, várias modificações dos exames bioquímicos convencionais têm sido utilizadas nos últimos anos para reduzir a duração de cada teste e para sistematizar o processo de identificação. Os sistemas de testes múltiplos foram desenvolvidos para possibilitar que um substracto teste reacções tais como indol, nitrato, mobilidade e descarboxilase (exemplo: sistema de identificação API). O substracto pode ser inoculado com uma única manipulação, ao invés de várias. Após uma incubação de 18 a 24 horas, pode ser feita a identificação pela atribuição de um número para cada reacção. A

seguir, os dados são normalmente consultados num computador para a identificação do organismo, segundo a sequência de números atribuída às várias reacções (Marshall, 1995).

### **5.6.3. Identificação serológica**

Dentre outras aplicações os testes serológicos são úteis para: determinar o grupo serológico de um patógeno isolado por cultura (exemplo: *Vibrio cholerae* O1, espécies de *Salmonella*, *Shigella*, e *Streptococcus* de grupo A). Os testes de aglutinação são os mais usados devido à sua fácil execução, custos baixos e ao facto de não necessitarem de equipamentos especiais para a sua execução (podem ser efectuados em lâminas, tubos ou microplacas) (Cheesbrough, 1984).

A aglutinação é a aglomeração visível de bactérias, células, ou partículas, pela combinação de um antígeno com seu anticorpo específico (Cheesbrough, 1984).

## **5.7. Teste de sensibilidade aos antibióticos**

Certas bactérias devido à mutação genética, produção de enzimas capazes de destruir antimicrobianos, alteração da permeabilidade da membrana celular, mudança de metabolismo para sistemas metabólicos não afectados pelo antimicrobiano usado, tornam-se resistentes aos mesmos. Muitas vezes as amostras são enviadas ao laboratório de microbiologia para verificação da eficácia do tratamento antibiótico de determinada infecção bacteriana. (Cheesbrough, 1984).

Numa reunião organizada pela OMS em Geneva em 1977, foi expressa a preocupação sobre o aumento mundial da resistência a antimicrobianos associada com o uso crescente, e frequentemente indiscriminado dos mesmos em humanos e animais. Na actualidade, bactérias resistentes a antimicrobianos originaram várias erupções sérias de infecção, com muitas mortes. Isto conduziu a uma necessidade de desenhar programas de vigilância nacional e internacional para monitorar a resistência antimicrobiana em bactérias através de testes de susceptibilidade, usando métodos seguros que gerem dados comparáveis. A disponibilidade de informações microbiológicas e epidemiológicas ajuda os clínicos a seleccionar o agente antimicrobiano mais apropriado para o tratamento de uma infecção microbiana (World Health Organization, 2003).

Neste encontro, considerou-se que a técnica modificada de difusão de disco de Kirby–Bauer para qual exigências tinham sido estabelecidas pela OMS em 1976, poderia ser recomendada para propósitos clínicos e de vigilância devido à sua simplicidade de execução e reprodutibilidade. O método é particularmente satisfatório para uso com bactérias que pertencem a família *Enterobacteriaceae*, mas também pode ser recomendada como método geral para todos patógenos de crescimento rápido (World Health Organization, 2003).

## 6. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio a principal actividade desenvolvida foi o processamento microbiológico de amostras biológicas e identificação bacteriana. Para além desta, desenvolveram-se diversas outras actividades podendo se destacar a preparação de meios de cultura, apoio à preparação de aulas práticas de Microbiologia e a participação num estudo sobre *Tinea capitis* no sector de Micologia, realizado na SOS Aldeia de Crianças de Moçambique.

### 6.1. MATERIAL

Veja anexo 2.

### 6.2. METODOLOGIA DE TRABALHO

As amostras foram recebidas e processadas prontamente tendo-se em consideração a natureza das mesmas, o tipo de exame a efectuar e as espécies bacterianas a isolar. As amostras provieram de diferentes Hospitais e Centros de Saúde bem como de algumas Clínicas da Cidade de Maputo.

O processamento consistiu em inocular o material (amostra) num meio de cultura apropriado (veja anexo 3). Após a sua inoculação em meios, nas placas ou nos tubos, estes foram incubados numa estufa à 37 °C, durante 24 horas, tempo este que se estima ser suficiente para que se observe crescimento bacteriano. Para pesquisa de bactérias microaerofílicas as placas foram incubadas numa jarra com vela, de modo a criar um meio rico em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Outras placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas devido às exigências de crescimento da bactéria a ser pesquisada.

Passado o tempo de incubação, as placas foram lidas para observação das características morfológicas das colónias existentes, de modo a isolar aquelas que apresentavam morfologia sugestiva dos patógenos procurados. Para o isolamento dos microorganismos, foi usada uma técnica de sementeira das amostras que consistiu em espalha-las em zigue zague sobre a superfície dos meios nos quais foram inoculadas.

Após o isolamento, as colónias foram submetidas a testes de catalase e de oxidase. Uma porção de cada colónia foi colocada numa lâmina para execução do esfregaço e coloração de Gram. Outra porção de cada colónia foi submetida à provas bioquímicas que consistiram em observações das fermentações dos açúcares, para sua identificação. Juntamente a estas provas foram feitas outras provas como sejam: Produção de Ácido Sulfídrico, Teste de Urease, Prova do Citrato, Produção do Indol/ Mobilidade.

Depois de identificada a bactéria, fez-se o TSA, que consistiu em expô-la à acção de vários antibióticos tendo em consideração a bactéria em causa e observou-se o efeito destes no crescimento da bactéria.

### **6.2.1. Técnica de Gram**

A coloração de Gram foi usada para diferenciar bactérias Gram-positivas das Gram-negativas e para determinar a morfologia das mesmas.

#### **Princípio do teste**

A existência de diferentes graus de permeabilidade na parede celular dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, explica o princípio de funcionamento desta técnica. Segundo ela, ambos tipos de bactérias são coradas por cristal violeta. A adição de iodo forma um complexo dentro da parede celular. A adição de um descorante remove o corante primário dos organismos Gram negativos devido ao alto conteúdo de lípidos das mesmas. Estas células são coradas pela safranina que é o corante de contraste nesta técnica, sendo portanto vermelho (Murray *et al.*, 2004).

#### **Procedimento**

1. Prepara-se, seca-se e fixa-se o esfregaço com a chama do bico de bunsen.
2. Cobre-se com solução de violeta e deixa-se actuar por cerca de 60 segundos.

3. Retira-se o excesso do corante, e com a lâmina na posição oblíqua passa-se água corrente para remover o resto de corante.
4. Cobre-se a lâmina com lugol e deixa-se actuar por 60 segundos. Lava-se com água.
5. Cobre-se a lâmina com álcool absoluto (durante 30 segundos). Lava-se com água.
6. Aplica-se o corante de contraste (safranina) durante 1 minuto.
7. Lava-se com água e deixa-se secar à temperatura ambiente.
8. Observa-se ao microscópio com objectiva de óleo de imersão (100x).

### Interpretação

Bactérias Gram-positivas – coram de azul púrpura ou violeta.

Bactérias Gram-negativas – coram a vermelho ou cor-de-rosa.

### 6.2.2. Teste de Oxidase

O teste de oxidase foi usado para diferenciar espécies de *Pseudomonas* de espécies relacionadas. De referir que este teste pode também ser usado como auxiliar para diferenciação de *Neisseria*, *Moraxella*, *Campylobacter* e espécies de *Pasteurella* (oxidase-positivo).

#### Princípio do teste

Bactérias oxidase positivas possuem oxidase citocromo ou oxidase de indofenol (um féreo contendo hematoproteína). Estes ambos catalisam o transporte de electrões de compostos dadores (NADH) para receptores de electrões (normalmente oxigénio). O reagente do teste, N, N, N', N'-tetra-metil-p-phenylenediamine dihydrochloride age como um receptor artificial de electrões para a enzima oxidase. O reagente oxidado forma um composto colorido indofenol azul. O sistema citocromo é normalmente só presente em organismos aeróbios que são capazes de utilizar oxigénio como receptor final de hidrogénio. O produto final deste metabolismo é ou água ou peróxido de hidrogénio (quebrado por catalase) (Health Protection Agency, 2004b).

### **Procedimento/ Interpretação**

1. Deita-se o reagente de oxidase sobre um pedaço de papel-filtro em uma placa de Petri.
2. Colhe-se com uma ansa estéril algumas colónias do microorganismo suspeito e colocou-se sobre a gota do reagente sobre o papel de filtro.
3. Se a colónia for oxidase positiva, inicialmente ficará rosa, depois vermelha e depois preta. A reacção deve ocorrer imediatamente. Caso a reacção ocorra após 30 segundos, não se considera uma reacção positiva.

### **6.2.3. Teste de Catalase**

Este teste foi realizado para diferenciar as espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Este detecta a presença da enzima catalase nas bactérias.

#### **Princípio do teste**

O teste é usado para detectar a presença da enzima catalase pela decomposição de peróxido de hidrogénio para libertar oxigénio e água. O peróxido de hidrogénio é formado por algumas bactérias como produto final oxidativo da quebra aeróbica de açúcares, e é altamente tóxico quando acumulado (Health Protection Agency, 2006).

### **Procedimento/ Interpretação**

1. Retira-se com um palito de madeira ou uma agulha estéril, uma pequena porção de colónia e coloca-se em uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% em uma lâmina microscópica limpa (tendo cuidado para que não se retire com a camada do agar sangue, pois a hemoglobina poderá causar um teste falso positivo).
2. O aparecimento de bolhas de gás dentro de 10 segundos indica um teste de catalase positivo, sugerindo tratar-se de uma espécie de *Staphylococcus*, no caso de bactérias em forma de coco, Gram positivos.

3. A ausência de bolhas é um teste de catalase negativo e indica espécies de *Streptococcus*, caso sejam cocos Gram positivos.
4. Tratando-se de uma bactéria catalase positiva, faz-se um teste coagulase para diferenciar *Staphylococcus aureus* de outros *Staphylococcus*.

#### 6.2.4. Teste de Coagulase

O teste de coagulase foi executado para diferenciar membros do género *Staphylococcus*, pela sua habilidade em coagular o protoplasma pela acção da enzima coagulase.

##### Princípio do teste

A enzima coagulase existe em duas formas: uma ligada à parede celular e outra livre (libertada pelas paredes celulares). A coagulase ligada é detectada pelo teste de coagulase em lâmina, enquanto que a coagulase livre é detectada pelo teste de coagulase em tubo. A coagulase ligada, adsorve fibrinogénio do protoplasma alterando-o, precipitando assim no *Staphylococcus*, causando um acúmulo destes, resultando na aglutinação da célula. A coagulase livre reage com uma substância no protoplasma para formar um coágulo de fibrina (Health Protection Agency, 2005b).

##### Procedimento/ Interpretação

1. Faz-se pelo método do tubo.
2. Mistura-se uma pequena quantidade de cultura com um plasma comercial para coagulase (plasma humano) em um tubo.
3. Incuba-se o tubo de plasma inoculado com uma pequena porção de cultura por quatro horas e controla-se em intervalos de uma hora para ver se o plasma formou um coágulo de fibrina (sólido ou mais espesso), indicando positividade do teste, sugerindo tratar-se de *Staphylococcus aureus*.

4. Um teste de coagulase negativo, indica que se trata de *Staphylococcus epidermidis* ou de outros *Staphylococcus* coagulase-negativos.

### **6.2.5. Teste de Sensibilidade à Bacitracina**

Este teste foi usado para auxiliar a identificação de espécies de *Streptococcus*.

#### **Princípio do teste**

O disco de bacitracina é um teste de sensibilidade usado para diferenciar *Streptococcus* beta-hemolíticos (Murray *et al.*, 2004).

#### **Procedimento**

1. Selecciona-se uma colónia, inocula-se em soro fisiológico para criar uma suspensão.
2. Semeia-se a suspensão em agar sangue.
3. Coloca-se um disco de bacitracina.
4. Incubou-se a placa durante 18 a 24 horas em CO<sub>2</sub> a 37 °C. Depois da incubação faz-se a leitura e interpretação do resultado.

#### **Interpretação**

Qualquer zona de inibição é considerada um teste positivo ou teste sensível e sugere tratar-se de *Streptococcus pyogenes* (grupo A).

Crescimento à volta do disco é interpretado como um teste negativo ou teste resistente.

### 6.2.6. Teste de Sensibilidade à Optoquina

Este teste foi usado para auxiliar a identificação de espécies de *Streptococcus*.

#### Princípio do teste

O propósito do teste de optoquina é confirmar a identificação *Streptococcus pneumoniae* antes de efectuar testes serológicos e auxiliar na diferenciação de *S. pneumoniae* de estreptococos do grupo viridans durante estudos de vigilância (Murray *et al.*, 2004).

#### Procedimento

1. Selecciona-se uma colónia, inocula-se em soro fisiológico para criar uma suspensão.
2. Semeia-se a suspensão em agar sangue.
3. Coloca-se um disco de optoquina.
4. Incuba-se a placa durante 18 a 24 horas em CO<sub>2</sub> a 37 °C. Depois do período de incubação, procede-se à leitura e interpretação do resultado.

#### Interpretação

Se for usado um disco de 6 mm, uma zona de inibição de 14 mm ou mais em diâmetro é considerada uma reacção positiva para identificação de pneumococos.

Uma zona de inibição entre 6 e 14 mm em diâmetro é considerada questionável para identificação de pneumococos e um teste de solubilidade de bilis deveria ser executado.

### 6.2.7. Teste de Kligler

Este teste foi usado como auxiliar na diferenciação de géneros da família Enterobacteriaceae.

#### Princípio do teste

O meio Kligler Iron Agar é composto por dois açúcares (glicose e lactose). O teste consiste em observar as reacções de fermentação dos açúcares pela mudança de cor do meio indicando uma reacção ácida ou alcalina. A acidificação do meio, consequente à fermentação dos açúcares, provoca a viragem do indicador (vermelho fenol) de vermelho para amarelo, mas diferente é a forma da sua apresentação dependendo da acidificação unicamente da glucose ou também de um ou ambos outros açúcares (Folgosa e Martelli, 1985).

#### Procedimento

1. Inocula-se uma colónia, usando uma agulha de inoculação, no tubo contendo meio KIA inclinado, por picada na base e estrias na região inclinada do meio.
2. Incuba-se a 37 °C, durante 24 horas e observam-se as reacções de fermentação de açúcares, a produção de gás e a produção de ácido sulfídrico.

#### Interpretação

Fundo vermelho: não fermentação de glicose (reacção negativa).

Língua vermelha: não fermentação de lactose (reacção negativa).

Fundo amarelo: fermentação de glicose (reacção positiva).

Língua amarela: fermentação de lactose (reacção positiva).

Côr negra mais ou menos difusa = produção de H<sub>2</sub>S (reacção positiva).

Ausência de cor negra = não produção de H<sub>2</sub>S (reacção negativa).

Fendas ou bolhas no fundo do tubo = produção de gás (reacção positiva).

Ausência de fendas ou bolhas = não produção de gás (reacção negativa).

### **6.2.8. Teste de Citrato**

O teste de citrato foi usado como componente de diferenciação de géneros da família Enterobacteriaceae.

#### **Princípio do teste**

O teste consiste em usar o citrato como única fonte de energia para a bactéria.

#### **Procedimento**

1. Inocula-se com uma agulha de inoculação, no tubo contendo meio Citrato de Simmons inclinado, por picada na base e estrias na região inclinada do meio.
2. Incuba-se a 37 °C, durante 24 horas e observa-se a mudança de cor do meio verde para azul.

#### **Interpretação**

Côr azul: reacção positiva.

Côr verde: reacção negativa.

### **6.2.9. Teste de Indol**

O teste de indol foi efectuado como auxiliar na diferenciação de géneros da família Enterobacteriaceae e outros géneros, este detecta a produção de triptofanase.

### **Princípio do teste**

O teste de indol determina a habilidade de um organismo para produzir indol da degradação do aminoácido triptofano. Triptofano é hidrolisado por triptofanase para produzir três possíveis produtos finais – um dos quais é indol (Health Protection Agency, 2004c).

### **Procedimento**

1. Inocula-se a colónia suspeita no meio SIM com uma agulha.
2. Incuba-se a 37 °C durante 24 horas.
3. Para testar a produção de indol, adiciona-se ao tubo algumas gotas do reagente Kovacs (composto por: p-dimetilaminobenzaldeído, álcool amílico, ácido clorídrico concentrado) e observa-se a mudança de cor.

### **Interpretação**

Aparecimento de anel vermelho = produção de indol (reação positiva).

Ausência de anel vermelho = não produção de indol (reação negativa).

## **6.2.10. Teste de Mobilidade**

Este teste foi usado como componente de auxílio na diferenciação de géneros da família Enterobacteriaceae. Geralmente os organismos móveis são bacilos embora existam alguns cocos móveis.

### **Princípio do teste**

Este teste é usado para determinar se organismos são móveis por meio de flagelos. O local dos flagelos é determinado pelas espécies bacterianas. Bactérias não-móveis não possuem flagelos. A produção de flagelos também está sujeita às condições de cultura; por exemplo, algumas

bactérias são móveis a temperaturas diferentes para as quais elas são normalmente incubadas, exemplo: *Yersinia enterocolitica* é móvel de 20-25°C, mas não a 37°C. Algumas bactérias como espécies de *Capnocytophaga* exibem uma mobilidade fraca (Health Protection Agency, 2004d).

### **Procedimento**

1. Inocula-se a colónia suspeita no meio SIM com uma agulha.
2. Incuba-se a 37 °C durante 24 horas.
3. Depois da incubação faz-se a leitura e interpretação do resultado.

### **Interpretação**

Crescimento difuso no meio indica mobilidade da bactéria (reacção positiva).

Crescimento na linha de inoculação indica não mobilidade da bactéria (reacção negativa).

### **6.2.11. Teste de Urease**

Este teste foi usado para diferenciação de espécies de *Proteus* urease positivas de outros membros da família Enterobacteriaceae.

#### **Princípio do teste**

O teste de urease é usado para determinar a habilidade de um organismo para dividir urea através da produção da enzima urease. São formadas duas unidades de amónio com alcalinidade resultante. A produção de substância alcalina é detectada por um indicador de pH. Christensen's Urea contém indicador de pH fenol vermelho que em condições ácidas (pH 6.8) é amarelo e em condições alcalinas (pH 8.4) o indicador vira os meios para rosa (Health Protection Agency, 2004e).

### **Procedimento**

1. Inocula-se a colónia suspeita no meio urea.
2. Incuba-se a 37 °C durante 24 horas.
3. Passadas 24 horas observa-se a viragem do indicador.

### **Interpretação**

Côr vermelha = reacção positiva.

Côr amarela = reacção negativa.

### **6.2.12. Teste de Sensibilidade aos Antibióticos**

O teste de sensibilidade aos antibióticos foi executado quando era patente a presença de infecção, e este serve de auxílio ao clínico na escolha do antimicrobiano correcto para o tratamento da doença. A técnica usada foi a de difusão de discos modificada por Kirby-Bauer.

#### **Princípio do teste**

O teste de sensibilidade aos antibióticos mede a habilidade de um agente de antimicrobiano inibir o crescimento bacteriano *in vitro*. Esta habilidade pode ser calculada pelo método de diluição ou de difusão (World Health Organization, 2003).

#### **Procedimento/ Interpretação**

##### **Técnica de Kirby-Bauer**

1. Pica-se uma colónia de teste com uma ansa e inocula-se num tubo 3ml de soro fisiológico estéril, mistura-se bem de modo a obter-se uma suspensão homogénea preferencialmente ajustada ao padrão 0,5 de MacFarland.
2. Molha-se uma zaragatoa estéril no soro fisiológico.

3. Em seguida, retira-se a zaragatoa pressionando-a contra a parede do tubo, de modo a eliminar o excesso do líquido.
4. Inocula-se de forma uniforme, com a zaragatoa, a superfície interna da placa com o meio e aguarda-se 5 minutos com a base da placa virada para cima.
5. Aplicam-se assepticamente os discos de antibióticos, de acordo com o tamanho da placa, de modo que cada uma tenha um número suficiente de discos, permitindo um bom distanciamento entre si.
6. Incubam-se as placas a 37 °C durante 24 horas.
7. Medem-se com uma craveira, os diâmetros das zonas de inibição de cada antibiótico.
8. Classificam-se as bactérias de acordo com a sua reacção para cada antibiótico, em R, I ou S. Sendo: R— resistente, I— intermediário e S— sensível (veja tabela 2 do anexo 1).

### **6.3. OUTRAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS**

- Preparação de meios de cultura;
- Apoio à preparação de aulas práticas de Microbiologia;
- Participação num estudo sobre *Tinea capitis* no sector de Micologia, realizado na SOS Aldeia de Crianças de Moçambique.

#### **6.3.1. Preparação de meios de cultura**

Para preparação de meios de cultura seguiram-se essencialmente as seguintes operações tomando sempre em consideração as indicações prescritas pelo fabricante:

##### **6.3.1.1. Pesagem dos componentes**

A pesagem é feita numa balança analítica directamente para um balão volumétrico adequado à quantidade que se pretendesse preparar.

#### **6.3.1.2. Dissolução em água**

A dissolução é feita num balão volumétrico de vidro, usando a quantidade de água destilada indicada. Em seguida aquece-se o balão em banho-maria agitando-se frequentemente. No caso de meios líquidos ou sólidos em tubos, após a dissolução deixa-se arrefecer e distribui-se nos frascos que servem de recipiente definitivo do meio. Quando se trata de meios sólidos em placas a distribuição é feita após a esterilização. Uma vez distribuído o meio nas placas, tampam-se as mesmas e deixam-se a temperatura ambiente até solidificação do meio.

#### **6.3.1.3. Esterilização**

É feita em autoclave a 121°C por 15 minutos. Alguns meios não são submetidos a este processo, devido à sua composição particular que não os permite a submissão à temperaturas elevadas; em seguida deixa-se arrefecer em banho-maria até 50 °C. No caso de meios líquidos ou sólidos em tubos, são esterilizados com as tampas dos frascos ligeiramente abertas; após a esterilização deixa-se arrefecer em banho-maria até 50°C. Os tubos que devem ter língua são postos a arrefecer na posição inclinada. Fecham-se as tampas dos tubos com os frascos ainda quentes.

#### **6.3.1.4. Distribuição**

Para os meios sólidos em placa, após o arrefecimento em banho-maria de 50°C, o meio é distribuído, directamente do balão em placas de Petri previamente esterilizadas. Este processo executa-se a menos de 20 cm do bico de Bunsen para assegurar a esterilidade do mesmo. A profundidade do meio na placa é de cerca de 4 mm. Em seguida deixa-se arrefecer para solidificar.

#### **6.3.1.5. Conservação**

Conservam-se tanto os tubos como as placas na geleira (2-8 °C). De referir que, as placas conservam-se com as tampas viradas para baixo dentro de sacos plásticos e etiquetadas com o nome do meio e a data de preparação.

## 6.4. RESULTADOS / DISCUSSÃO

Com o uso destas técnicas foi possível isolar diferentes estirpes bacterianas em algumas das amostras processadas como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Frequência de estirpes bacterianas isoladas em algumas das amostras processadas durante a segunda fase do estágio.

Tipo	AMOSTRAS RECEBIDAS		Estirpes bacterianas isoladas	Frequência Nº %
	Quantidade	Positivas		
FEZES	150	0	-	-
URINA	26	13	<i>Escherichia coli</i>	5/ 38,5
			<i>Klebsiella spp</i>	3/ 23,0
			<i>Kluyvera spp</i>	2/ 15,4
			<i>Staphylococcus aureus</i>	2/ 15,4
			<i>Proteus sp</i>	1/ 7,7
PUS	23	17	<i>Staphylococcus aureus</i>	12/ 70,6
			<i>Proteus sp</i>	2/ 11,7
			<i>Pseudomonas sp</i>	1/ 5,9
			<i>Streptococcus sp</i>	1/ 5,9
			<i>Staphylococcus albus</i>	1/ 5,9
SECREÇÃO OCULAR	4	3	<i>Staphylococcus aureus</i>	1/ 33,3
			<i>Streptococcus sp</i>	1/ 33,3
			<i>Staphylococcus albus</i>	1/ 33,3
EXPECTORACÃO	18	0	-	-
EXSUDATOS VAGINAIS	6	0	-	-
EXSUDATOS URETRAIS	5	0	-	-
EXSUDATO FARÍNGEO	1	0	-	-
LÍQUIDO PLEURAL	1	0	-	-
TOTAL	234	33	-	-

Processaram-se 150 amostras de fezes (tabela 1) durante o estágio, das quais não foi possível isolar estirpes bacterianas associadas às gastroenterites. A maior parte dos exames culturais de fezes foram efectuados para despiste de bactérias patogénicas em indivíduos assintomáticos, razão pela qual não se isolou nenhuma espécie bacteriana nas amostras de fezes testadas.

No que diz respeito as amostras de urina processadas, de referir que das 26 amostras recebidas, 13 foram consideradas positivas. Foi possível isolar diferentes bactérias com predominância de

*Escherichia coli* (tabela 1). Segundo Jawetz *et al.* (2000), do grande grupo das Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, é um bacilo Gram-negativo, responsável por mais de 80% de todas infecções das vias urinárias adquiridas na comunidade, bem como pela maioria das infecções hospitalares. Esta pode ser uma provável explicação deste facto.

No que concerne às amostras de pús, foram recebidas e processadas 23 destas, colhidas em diferentes regiões corporais, das quais 17 registaram crescimento de flora bacteriana patogénica, e *Staphylococcus aureus* foi a bactéria predominante (tabela 1). Segundo Murray *et al.* (2004), *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo, membro da flora normal da pele e da mucosa de seres humanos, pode sobreviver em superfícies secas por longos períodos, dissemina-se de pessoa a pessoa através de contacto directo ou exposição a fômites contaminados (por exemplo roupas, roupas de cama). Esta bactéria está muitas vezes implicada em infecções de ferimentos, o que explica a sua predominância em amostras de pús.

Das 4 amostras de secreção ocular processadas, 3 registaram crescimento de flora bacteriana patogénica, tendo sido isolado as seguintes bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* e *Streptococcus sp* (tabela 1).

Foram processadas durante o estágio 18 amostras de expectoração. Não foi possível isolar espécies bacterianas patogénicas (tabela 1), o que não descarta a possibilidade da existência de outros microorganismos que não fossem bactérias.

Durante o estágio foram processadas 6 amostras de exsudatos vaginais e 5 de exsudatos uretrais. Não foi possível identificar espécies bacterianas patogénicas (tabela 1), sem querer dizer que não existissem outros microorganismos que não fossem bactérias.

Quando testadas aos antibióticos as estirpes isoladas comportaram-se de maneiras diferentes, como ilustram as tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Sensibilidade de estirpes isoladas em amostras de urina aos antibióticos.

Antibióticos usados	<i>Escherichia coli</i> N=5			<i>Klebsiella spp</i> N=3			<i>Kluyvera spp</i> N=2			<i>Proteus spp</i> N=1			<i>Staphylococcus aureus</i> N=2		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Ácido nalidíxico	60	-	40	66,7	-	33,3	50	-	50	100			n		
Ciprofloxacina	60	-	40	33,3	33,3	33,3	50	-	50	100			100	-	-
Cloranfenicol	-	-	100	33,3	-	66,7	100	-	-				100	100	-
Cotrimoxazol	20	-	80	-	-	100	-	-	100				100	-	50
Eritromicina	-	-	100	-	33,3	66,7	-	50	50				100	-	50
Gentamicina	80	-	20	33,3	-	66,7	50	-	50				100	50	-
Penicilina G	-	-	100	n			-	-		n			50	-	50

Tabela 3. Sensibilidade de estirpes isoladas em amostras de pús aos antibióticos.

Antibióticos usados	<i>Staphylococcus aureus</i> N=12			<i>Proteus spp</i> N=2			<i>Staphylococcus albus</i> N=1			<i>Streptococcus sp</i> N=1			<i>Pseudomonas spp</i> N=1		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina	-	-	100	n			n					100	n		
Ciprofloxacina	100	-	-	50	-	50	100			100			100		
Cloranfenicol	83,3	-	16,7	-	-	100	100						100		100
Cotrimoxazol	50	8,3	41,7	-	-	100			100				100		100
Eritromicina	66,7	-	33,3	-	-	100		100			100				100
Gentamicina	91,7	-	8,3	-	-	100	100			100					100
Penicilina G	-	-	100	n					100				100		100

Tabela 4. Sensibilidade de estirpes isoladas em amostras de secreção ocular aos antibióticos.

Antibióticos usados	<i>Staphylococcus aureus</i> N=1			<i>Staphylococcus albus</i> N=1			<i>Streptococcus sp</i> N=1		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina			100	n					100
Ciprofloxacina	100						100		100
Cloranfenicol	100						100		100
Cotrimoxazol		100					100		100
Eritromicina	100			100					100
Gentamicina	100						100		100
Penicilina G	n						100		100

## Legenda:

S= sensível

I= intermediária

R= resistente

n= antibiótico não usado

N= estirpes submetidas ao TSA.

No que concerne à sensibilidade das estirpes isoladas em amostras de urina, de referir que estas, mostraram ser mais sensíveis à Ciprofloxacina embora algumas estirpes resistentes fossem detectadas, e menos sensíveis à Eritromicina (veja tabela 2). Dos antibióticos usados para testar a sensibilidade das estirpes isoladas em amostras de pús, o mais eficaz foi Ciprofloxacina, enquanto Ampicilina e Penicilina G foram os menos eficazes (veja tabela 3). A tabela 4, mostra o comportamento das estirpes bacterianas isoladas em secreções oculares em relação ao Teste de Sensibilidade aos Antibióticos. Através das tabelas é possível observar uma tendência das estirpes bacterianas tornarem-se resistentes aos antibióticos. Este é um fenómeno que preocupa a sociedade à muito tempo. O fácil acesso aos antimicrobianos, o seu uso crescente e indiscriminado, podem ser apontados como factores que contribuem para a selecção de estirpes bacterianas resistentes aos mesmos, trazendo muitas dificuldades no tratamento de doenças.

## 7. PERSPECTIVA CRÍTICA DOS PROCESSOS DE TRABALHO DA UNIDADE DE ESTÁGIO

No que concerne aos processos de trabalho da unidade de estágio, mais propriamente do sector de Bacteriologia, há que referir ao cumprimento de normas internacionais na execução de técnicas para a identificação de bactérias. Todavia, deve-se ressaltar que embora as técnicas usadas sejam correctas e aplicadas internacionalmente para o mesmo fim, estas ainda se tornam insuficientes visto que, em determinados casos a identificação se prende ao género bacteriano, não sendo possível chegar à espécie e às variantes serológicas destas. Esta é uma situação de certa forma negativa, principalmente quando se trata de casos de cultura de fezes, em que *Escherichia coli* é muitas vezes dada como membro da flora normal intestinal. Entretanto, existem pelo menos seis grupos diferentes patogénicos implicados com gastroenterites (ETEC, EPEC; EIEC, EHEC, EAEC, DAEC) a maioria em países em vias de desenvolvimento.

## ANEXO 1.

Tabela 1. Cronograma de actividades.

FASES	PERÍODO	ACTIVIDADES
Primeira	Março – Maio	Período de adaptação e elaboração do Protocolo.
Segunda	Julho	Preparação dos meios.
	Agosto – Outubro.	Processamento das amostras.
	Novembro	Elaboração e entrega do relatório final.

Tabela 2. Interpretação do tamanho das zonas de inibição dos antibióticos para bactérias de crescimento rápido, usando a técnica modificada de Kirby-Bauer\*

Agente Antimicrobiano	Diâmetro da zona de inibição (mm)			
	Potência do disco	Resistente	Intermediário	Sensível
Ácido nalidixico <sup>a</sup>	30µg	<13	14-18	≥19
Amoxy – clav <sup>b</sup>	20/ 10µg	<13	14-17	>18
Ampicilina, para Enterobacteriaceae	10µg	<13	14-16	>17
Enterococcus	10µg	<16	–	>17
Benzilpenicilina, para <i>Staphylococcus</i>	10IU	<28	–	>29
<i>Enterococcus</i>	10IU	<14	–	>15
Cefalotina	30µg	<14	15-17	>18
Cefalozina	30µg	<14	15-17	>18
Cloranfenicol	30µg	<12	13-17	>18
Ciprofloxacina	5µg	<15	16-20	>21
Co-triomoxazol	25µg	<10	11-15	≥16
Eritromicina	15µg	<13	14-22	>23
Gentamicina	10µg	<12	13-14	>15
Nitrofurantoina <sup>a</sup>	300µg	<14	15-16	>17
Norfloxacina <sup>a</sup>	10µg	<12	13-16	>17
Oxacilina	1µg	<10	10-12	>13
Tetraciclina	30µg	<14	15-18	>19
Vancomicina, para <i>Staphylococcus</i>	30µg	–	–	>15
<i>Enterococcus</i>	30µg	<14	15-16	>17

\*FONTE: WHO (2003). / <sup>a</sup>Somente aplicados para testar estirpes isoladas de infecções urinárias e alguns patógenos entéricos. / <sup>b</sup>Amoxicilina e ácido clavulânico (inibidor de β-lactamase).

## ANEXO 2. MATERIAL

- Microscópio óptico
- Lâminas microscópicas
- Lamelas
- Incubadora bacteriológica (37 °C)
- Bico de bunsen
- Luvas
- Geleira
- Micropipeta calibrada
- Amostras biológicas
- Tubos de ensaio
- Suportes para tubos de ensaio
- Ansa bacteriológica
- Tubos de cultura
- Zaragatoas estéreis
- Espátulas de vidro em L
- Placas de Petri
- Jarras de incubação
- Velas
- Óleo de imersão
- Discos de antibióticos
- Hidróxido de potássio (KOH)
- Reagente de Kovacs
- Padrão de turvação de Mac-Farland
- Kit de Gram
- Kit de Ziehl-Nielsen

### Meios

- Agar MacConkey
- Agar Sangue
- Agar Chocolate
- Agar Thayer-Martin
- Agar TCBS
- Agar SS
- Agar Sabouraud
- Agar XLD
- KIA
- SIM
- Citrato
- Ureia
- Agar Mueller-Hinton
- Stuart
- Soro fisiológico

## 8. CONCLUSÕES

O trabalho de estágio como vertente de culminação de um curso, é de grande relevância dado que este incute no estudante uma nova dinâmica no processo de aprendizagem, permitindo que o mesmo consolide e alie os conhecimentos teóricos adquiridos durante a formação aos conhecimentos práticos. Desta forma, o estudante pode analisar as diferentes circunstâncias negativas da sociedade e através do sinergismo (teoria-prática) desenvolver estratégias no sentido de resolvê-las. O mesmo abre uma visão crítica no estudante, oferecendo conhecimentos sobre a deontologia profissional, capacidade para trabalhar em equipa e individualmente, criatividade, responsabilidade e maturidade profissional.

O crescente número de casos de infecções causadas por bactérias e o aumento da frequência de pedidos de exames culturais de amostras biológicas em laboratórios de Microbiologia, no sector de Bacteriologia, para identificação das mesmas e determinação da sensibilidade destas aos antibióticos, traz a necessidade de aumento de pessoal com habilidades para execução dessas técnicas, sendo fundamental no auxílio do Clínico para a prescrição do antibacteriano apropriado. Contribuindo deste modo, na minimização da escassez de indivíduos capazes de desenvolver essas actividades, melhorando o atendimento do paciente.

Durante a segunda fase do estágio foram recebidas um total de 234 amostras das quais: 26 de urina, 150 de fezes, 23 de secreções purulentas, 6 de exsudatos vaginais e 5 de uretrais, 18 de expectoração, 4 de secreção ocular, 1 de exsudato faríngeo e 1 de líquido pleural. Foram identificadas com maior frequência: *Staphylococcus aureus* (70,6%) em amostras de pús (secreções purulentas), e *Escherichia coli* (38,5%) em amostras de urina. Não foi possível isolar bactérias nas seguintes amostras: fezes, exsudatos vaginais e uretrais, expectoração, exsudato faríngeo e líquido pleural.

Com estágio o estudante desenvolveu habilidades técnicas na identificação laboratorial de bactérias, incluindo o teste de sensibilidade aos antibióticos.

## 9. RECOMENDAÇÕES

No concernente à falta de reagentes e equipamentos para a execução de determinados testes serológicos, recomenda-se a criação de parcerias com outras instituições relacionadas, ou aumento orçamental da verba destinado ao laboratório no sentido de se superarem as dificuldades supracitadas.

A Microbiologia é uma ciência em constante avanço, novos casos têm surgido e certas técnicas têm sofrido modificações significativas, o que torna necessária a actualização de técnicos que trabalham nesse âmbito. Neste contexto, recomenda-se a criação de oportunidades para que os técnicos possam participar em cursos de actualização no âmbito do seu trabalho através da cooperação com outros laboratórios nacionais e internacionais, o que contribuirá positivamente para introdução de novas técnicas e melhoramento das metodologias usadas para execução das mesmas.

O uso frequente e indiscriminado dos antibióticos, é um dos factores que muitas vezes contribui para a selecção de estirpes bacterianas resistentes, originando complicações e dificuldades no tratamento das doenças. Com isso, recomenda-se à sociedade em geral a evitar a auto-medicação, devendo para isso consultar o Clínico sempre que apresentar sintomas de alguma doença, e aos farmacêuticos a não venderem antibióticos a pacientes que não apresentarem a prescrição Clínica dos mesmos.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Cheesbrough, Monica (1984). *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries*, volume II: Microbiology. 479pp. Great Britain, ELBS.
- ❖ Folgosa, E. M. P. e J. Mondlane (2005). *Manual de Práticas de Microbiologia*. 3ª edição, 62pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.
- ❖ Folgosa, E. M. P. e A. Martelli (1985). *Bacteriologia Médica: Manual de Laboratório*. 204pp. Maputo, Ministério de Saúde.
- ❖ Health Protection Agency (2006). *Catalase Test*. National Standard Method BSOP TP 8 Issue 1. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- ❖ Health Protection Agency (2005a). *Introduction of the Preliminary Identification of Medically Important Bacteria*. National Standard Method BSOP ID 1 Issue 1. [http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- ❖ Health Protection Agency (2005b). *Coagulase Test*. National Standard Method BSOP TP 10 Issue 3. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- ❖ Health Protection Agency (2004a). *Inoculation of Culture Media*. National Standard Method BSOP 54 Issue 4. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_bacteriology.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_bacteriology.asp).
- ❖ Health Protection Agency (2004b). *Oxidase Test*. National Standard Method BSOP TP 26 Issue 1. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- ❖ Health Protection Agency (2004c). *Indole Test*. National Standard Method BSOP TP 19 Issue 1. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).

- ❖ Health Protection Agency (2004d). *Motility test*. National Standard Method BSOP TP 21 Issue 1. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- ❖ Health Protection Agency (2004e). *Urease Test*. National Standard Method BSOP TP 36 Issue 1. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).
- ❖ Jawetz, E., J. L. Melnick, A. E. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel e A. S. Morse (2000). *Microbiologia Médica*. 21ª edição, 518pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ❖ Laboratório de Microbiologia (1999).
- ❖ Lima, A. O., J. B. Soares, J. B. Greco, J. Galizzi e J. R. Cançado (1992). *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica: Técnica e Interpretação*. 7ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ❖ Marshall, Jacquelyn R. (1995). *Microbiologia: Manual de Laboratório Clínico*. 161pp. São Paulo, Livraria Santos.
- ❖ Murray, P. R., K. S. Rosenthal, G. S. Kobayashi e M. A. Pfaller (2004). *Microbiologia Médica*. 4ª edição, 762pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ❖ Ravel, Richard (1997). *Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais*. 6ª edição, 616pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ❖ Walters, N. J., B. H. Estridge e A. P. R. Reynolds (1997). *Laboratório Clínico: Técnicas Básicas*. 3ª edição, 482pp. Porto Alegre, ARTMED.
- ❖ World Health Organization (2003). *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edition, 167pp. Geneva.

# ANEXOS

ANEXO 1. Tabelas

ANEXO 2. Material

ANEXO 3. Cultivo das amostras

## ANEXO 3. CULTIVO DAS AMOSTRAS

### 1. URINA

1. Utiliza-se uma pipeta calibrada 100µl, inocula-se uma placa de agar MacConkey e uma placa de agar sangue.
2. Com uma espátula de vidro em L previamente esterilizada, espalha-se o inóculo sobre cada um dos meios de modo a se obter colónias isoladas.
3. A espátula é esterilizada novamente antes de ser colocada no suporte.
4. Incubam-se ambas as placas à 37 °C, durante 24 horas.

### 2. FEZES

1. Inoculam-se placas de XLD e MacConkey, semeiam-se com uma ansa ou zaragatoa, para conseguir colónias isoladas.
2. Em casos de pesquisa de *Vibrio cholerae*, inocula-se uma porção da amostra em APA, e semeia-se em placas de TCBS após 2 horas de incubação a 37 °C, todavia, pode-se semeiar directamente sem precisar da inoculação em APA.
3. Para pesquisa de *Salmonella* e *Shigella*, inocula-se uma porção da amostra em caldo de selenite, e semeia-se em placas de XLD ou SS após 24 horas de incubação a 37 °C, todavia, pode-se semeiar directamente sem precisar da inoculação em caldo de selenite.
4. Incubam-se todos os meios na estufa à 37 °C durante 24 horas.

### 3. EXSUDATOS VAGINAIS E URETRAIS

1. Com zaragatoa, semeia-se uma placa de Thayer-Martin e incuba-se a 37 °C numa jarra com vela, durante 48 horas.
2. Semeia-se uma placa de Sabouraud e incuba-se a 37 °C durante 24 horas.

#### **4. EXSUDATO CONJUNTIVAL**

1. Semeia-se uma placa dos seguintes meios: agar sangue, agar MacConkey, agar TM e agar Sabouraud (com cloranfenicol ou gentamicina).
2. Incubam-se todas as placas a 37 °C, 24 a 48 horas.
3. Se necessário faz-se uma subcultura.

#### **5. EXPECTORAÇÃO**

1. Dilui-se o material e semeia-se uma quantidade de 0,1 ml, por cada placa dos meios: agar TM, agar sangue, agar MacConkey e agar Sabouraud (com cloranfenicol ou gentamicina).
2. Distribui-se o material na superfície das placas de maneira uniforme por meio de espátulas estéreis.
3. Incubam-se as mesmas a 37 °C durante 18 a 24 horas.
4. Em casos de suspeita de infecção tuberculosa, ou no controle durante o curso clínico da doença já diagnosticada, prepara-se uma lâmina com esfregaço e procede-se a coloração de Ziehl-Neelsen.

#### **6. EXSUDATO FARÍNGEO**

1. A sementeira efectua-se directamente pela zaragatoa para os seguintes meios: agar MacConkey, agar sangue, agar Sabouraud (com cloranfenicol ou gentamicina).
2. Incubam-se as placas a 37 °C durante 18 a 24 horas.

## **7. OUTROS MATERIAIS PURULENTOS**

1. Faz-se uma observação microscópica directa do material (coloração de Gram).
2. Semeia-se o pús directamente pela zaragatoa nos seguintes meios: agar sangue, agar MacConkey, agar Sabouraud.
3. Incubam-se as placas à 37°C durante 18 a 24 horas.

## **8. LÍQUIDO PLEURAL**

1. É necessário preparar sempre duas lâminas, pois uma é corada pelo método de Gram e a outra pelo método de Ziehl-Neelsen.
2. Efectua-se o cultivo mesmo quando exame bacterioscópico for negativo.
3. Semeia-se em meios usados para sementeira de expectoração.
4. Incubam-se as placas à 37°C durante 18 a 24 horas.