



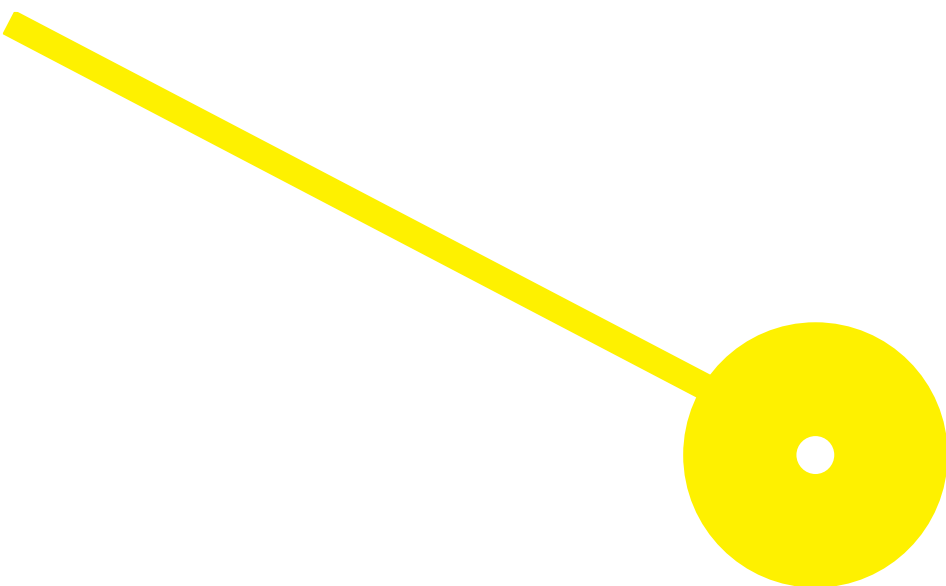
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA: RAMO MICROBIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

# Amigdalite estreptocócica: casuística de uma urgência pediátrica

Inês Raquel Prado de Oliveira Roque

07/2021





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Centro Hospitalar  
de Entre o Douro e Vouga, E.P.E.**

## **Amigdalite estreptocócica: casuística de uma urgência pediátrica**

### **Autor**

Inês Raquel Prado de Oliveira Roque

### **Orientadores**

Professor Doutor | Maria do Céu Ribeiro Lamas | ESS IPP

Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica | Liliana Catarina de Sá Mendes de Melo | HSS CHEDV

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo de Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## Agradecimentos

Aos meus pais, que sempre fizeram de tudo, para me proporcionar o melhor e por estarem sempre ao meu lado, a torcer por mim. Ao meu irmão por me ajudar em todas as fases da minha vida, por me motivar e ser o meu grande apoio, estando sempre presente. À minha irmã e a toda a minha família por me ouvirem, apoiarem e torcerem pelo meu melhor.

Aos meus amigos de sempre, as Inês, Francisca, Daniela, Tiago e Bruno por estarem sempre presentes e me apoiarem em todos os momentos da minha vida. Ao Alex, por ser o meu grande porto seguro.

Aos meus colegas de curso, os Ruis, Mariana, Inês e Margarida por terem partilhado comigo estas aventuras e vivenciado os últimos anos a meu lado, ficando assim para sempre marcados nesta fase da minha vida.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria da Feira, por me ter acolhido e proporcionado a melhor experiência possível, com uma palavra de especial gratidão às minhas orientadoras de estágio, Liliana e Dr<sup>a</sup>. Amélia, por terem sido o meu grande apoio ao longo destes últimos meses, por me terem transmitido parte do seu vasto conhecimento, sempre com muito carinho e dedicação, sem elas nada teria sido possível.

À Escola Superior de Saúde, por contribuir para a minha formação académica e a todos os professores que para isso colaboraram, estando presentes ao longo do percurso. E por fim, um especial agradecimento à Professora Maria do Céu Lamas, pela sua disponibilidade, prontidão e todos os seus conselhos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

O presente relatório consiste na descrição das práticas desenvolvidas durante os 6 meses de estágio curricular realizado no laboratório de Microbiologia, integrado no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São Sebastião (HSS). Este estágio teve como principal objetivo a aquisição de conhecimentos relacionados com o tema, assim como a aprendizagem das várias técnicas realizadas na rotina deste laboratório, de forma a aprofundar e conseqüentemente enriquecer a formação na área da Microbiologia Clínica.

Neste âmbito, o projeto desenvolvido consistiu o estudo e caracterização do principal agente etiológico responsável por amigdalites de origem bacteriana em crianças e adolescentes – *Streptococcus pyogenes*, e teve como objetivo, através de análise estatística, caracterizar e comparar os resultados obtidos nos exames bacteriológicos de exsudados da orofaringe no período de 1 de janeiro de 2019 a 31 de dezembro de 2020 segundo o sexo, faixa etária e meses do ano com maior prevalência da infeção, e resultados do teste rápido imunocromatográfico sempre que realizados em simultâneo para cada amostra, assim como o seu perfil de sensibilidade e especificidade relativa.

Pela análise dos resultados, verificou-se a diminuição de incidência da infeção em 2020, em relação ao ano anterior, no entanto foi observado um grande aumento no número de testes pedidos. Não se verificaram diferenças significativas relativamente ao sexo, o que está de acordo com a bibliografia. Em contrapartida, a incidência da infeção estreptocócica varia segundo a faixa etária sendo superior nos indivíduos entre os 3 e os 11 anos, o que está de acordo com os estudos referidos. Em relação ao mês da ocorrência da infeção, ao contrário do previsto pela literatura, não foi observada uma diferença significativa correspondente às épocas sazonais. Observou-se ainda concordância entre os resultados obtidos por exame cultural e testes imunocromatográficos, o que determina assim a eficácia do protocolo estabelecido, no entanto foi obtido um perfil de sensibilidade e especificidade menor do que o assumido pela casa comercial responsável pelo teste.

**Palavras-chave:** Microbiologia Clínica, *Streptococcus pyogenes*, amigdalite estreptocócica, idade pediátrica.

## Abstract

This report consists of the description of the practices developed during the 6 months of curricular internship carried out in the Microbiology laboratory, integrated in the Clinical Pathology Service of the Hospital de São Sebastião (HSS). This internship had as its main goal the acquisition of knowledge related to the subject, as well as the learning of the various techniques carried out in the routine of this laboratory, to develop and consequently improve training in the Clinical Microbiology field.

In this context, the project developed consisted in the study and characterization of the main etiological agent responsible for tonsillitis of bacterial origin in children and adolescents – *Streptococcus pyogenes*, and aimed, through statistical analysis, to characterize and compare the results obtained in bacteriological examinations of oropharyngeal exudates in the period from January 1<sup>st</sup>, 2019 to December 31<sup>st</sup>, 2020, according to sex, age group and months of the year with the highest prevalence of infection, and results of the rapid immunochromatographic test whenever performed simultaneously for each sample, as well as its sensitivity and relative specificity profile.

By the analyses of the results, there was a decrease in the incidence of infection in 2020, compared to the previous year, however there was a large increase in the number of tests requested. There were no significant differences regarding sex, which agrees with the bibliography. On the other hand, the incidence of streptococcal infections varies according to the age group, being higher in individuals between 3 and 11 years old, which agrees with the studies mentioned. Regarding the month of occurrence of the infection, contrary to what is predicted in the literature, there was no significant difference corresponding to the seasonal periods. There was also observed the agreement between the results obtained by cultural examination and immunochromatographic tests, which consequently determines the effectiveness of the established protocol, however, was obtained a lower sensitivity and specificity profile than assumed by the commercial house responsible for the test.

**Keywords:** Clinical Microbiology, *Streptococcus pyogenes*, streptococcal tonsillitis, pediatric age.

## Índice

1.	Caracterização do estágio.....	1
1.1.	Objetivos do estágio.....	1
2.	Diagnóstico Laboratorial em Microbiologia Clínica.....	1
2.1.	Processamento de amostras.....	2
2.1.1.	Meios de cultura.....	2
2.1.2.	Sementeiras.....	2
2.1.3.	Colorações.....	3
2.2.	Amostras biológicas.....	5
2.2.1.	Urina.....	5
2.2.2.	Fezes.....	5
2.2.3.	Exsudados genitais.....	6
2.2.4.	Hemoculturas.....	7
2.2.5.	Produtos respiratórios superiores.....	8
2.2.6.	Produtos respiratórios inferiores.....	8
2.2.7.	Líquidos biológicos.....	9
2.2.8.	Tecidos e exsudados de feridas.....	9
2.3.	Testes imunocromatográficos.....	10
2.4.	Testes de identificação presuntivos.....	10
2.4.1.	Catalase.....	10
2.4.2.	Coagulase.....	11
2.4.3.	Oxidase.....	12
2.4.4.	Indol.....	12
2.4.5.	Prova de Filamentação.....	12
2.4.6.	Teste dos Fatores de Crescimento X e V.....	13
2.5.	Teste rápido de aglutinação para <i>Streptococcus</i> do Grupo de <i>Lancefield</i> A, B, C, D, F e G.....	13
2.6.	Identificação de microrganismos.....	14
2.6.1.	Sistema automatizado.....	14
2.6.2.	Galerias API.....	14
2.7.	Antibiogramas.....	15
2.7.1.	Sistema automatizado.....	15
2.7.2.	Método de difusão em disco.....	15
2.7.3.	Gradiente de concentração.....	16

<b>2.8.</b>	Pesquisa de anaeróbios .....	16
<b>2.9.</b>	Pesquisa de micobactérias .....	16
<b>3.</b>	Amigdalite estreptocócica: casuística de uma urgência pediátrica.....	17
<b>3.1.</b>	Contextualização.....	17
<b>3.1.1.</b>	Amigdalite.....	17
<b>3.1.2.</b>	Amigdalite estreptocócica.....	18
<b>3.1.3.</b>	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	18
<b>3.2.</b>	Objetivos do projeto .....	20
<b>3.3.</b>	Metodologia .....	20
<b>3.3.1.</b>	Processamento do exame cultural.....	21
<b>3.3.2.</b>	Processamento do teste imunocromatográfico .....	22
<b>3.3.3.</b>	Análise estatística.....	23
<b>3.4.</b>	Resultados e discussão.....	23
<b>3.4.1.</b>	Resultados dos testes culturais nos anos 2019 e 2020.....	23
<b>3.4.2.</b>	Comparação dos resultados do teste rápido e do teste cultural.....	31
<b>4.</b>	Conclusão.....	34
	Referências Bibliográficas.....	35
	Anexos.....	40

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>μL</b>	Microlitro
<b>CHEDV</b>	Centro Hospitalar Entre Douro e Vouga
<b>CIN</b>	Novobiocina-Irgasan-Cefsulodina
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CNA</b>	Colistina e Ácido Nalidíxico
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>ESS</b>	Escola Superior de Saúde
<b>HSS</b>	Hospital de São Sebastião
<b>IPP</b>	Instituto Politécnico do Porto
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MIC</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>MRSA</b>	Staphylococcus Aureus Meticilina Resistentes
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina
<b>SGA</b>	Streptococcus do Grupo A de <i>Lancefield</i>
<b>SMAC</b>	Agar de MacConkey com Sorbitol
<b>SS</b>	Salmonella e Shigella
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colónias

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Tipos de sementeiras utilizadas no laboratório de Microbiologia. Sementeira por: Estria (A), Quadrantes (B), Gota C) e Maki (D).....	2
<b>Figura 2</b> – Teste rápido de aglutinação para identificação de Streptococcus do Grupo de Lancefield. Na imagem está representado um resultado positivo para a presença de Streptococcus pyogenes (Grupo A de Lancefield), presente no círculo 1, onde é visível a formação de agregados.....	14
<b>Figura 3</b> – Colónias características de Streptococcus pyogenes com halos de $\beta$ -hemólise. Adaptado de Medical Microbiology, Murray et al. 2016.....	21
<b>Figura 4</b> – Teste rápido imunocromatográfico utilizado para a deteção qualitativa de Streptococcus pyogenes, BIOSYNEX ®. Na imagem A está representado um teste com resultado válido negativo, com a presença de uma banda de cor no local do controlo (C) e nenhuma banda no local do teste (T). Na imagem B está representado um resultado válido positivo, com a presença de uma banda de cor na zona do controlo e uma segunda banda na zona do teste.....	22
<b>Figura 5</b> – Gráficos circulares com a percentagem de resultados positivos e negativos dos testes culturais realizados nos anos de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.....	24
<b>Figura 6</b> – Gráfico circular com a percentagem de doentes do sexo masculino e feminino que obtiveram um resultado positivo no teste cultural para a pesquisa de SGA durante os dois anos em estudo.....	26
<b>Figura 7</b> – Gráfico de barras com a percentagem de cada faixa etária dos doentes que obtiveram resultado positivo no teste cultural realizado durante o ano de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.....	28
<b>Figura 8</b> – Gráfico de barras com a percentagem de resultados positivos nos testes culturais para a pesquisa de SGA ao longo dos meses durante os anos de 2019 e 2020.....	30
<b>Figura 9</b> – Gráfico circular com a percentagem de resultados concordantes e discordantes entre os dois tipos de testes realizados em cada amostra para a pesquisa de SGA.....	32

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Resultados dos testes culturais de amostras processadas durante os anos de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.....	23
<b>Tabela 2</b> – Número de casos positivos do sexo masculino e feminino detetados nos testes culturais, durante os anos de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.....	25
<b>Tabela 3</b> – Número de casos positivos em cada faixa etária detetados nos testes culturais para a pesquisa de SGA durante os anos de 2019 e 2020.....	26
<b>Tabela 4</b> – Número de resultados positivos obtidos nos testes culturais durante os anos de 2019 e 2020, distribuídos consoante o mês da ocorrência da infecção.....	29
<b>Tabela 5</b> – Resultados dos testes rápidos imunocromatográficos e dos testes culturais realizados nas 513 amostras colhidas para a pesquisa de SGA provenientes do Serviço de Urgência Pediátrica, desde outubro de 2019 até dezembro de 2020.....	32

## **1. Caracterização do estágio**

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas e Saúde Pública decorreu ao longo de 6 meses, entre janeiro e julho de 2021, no Hospital de São Sebastião (HSS) em Santa Maria da Feira, no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica.

O laboratório de Microbiologia está dividido em três grandes áreas:

- a) Micro I, onde são processadas amostras biológicas tais como urinas, fezes e exsudados genitais.
- b) Micro II, onde são processadas amostras de hemoculturas, cateteres, trato respiratório (exsudados nasais e orofaríngeos, expetorações, aspirados e lavados), líquidos biológicos (exsudados purulentos, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, ascítico, abdominal, pericárdico), tecidos, entre outros.
- c) Micro III, onde é realizado o estudo e pesquisa de micobactérias.

### **1.1. Objetivos do estágio**

No âmbito dos objetivos do estágio, destaca-se a importância para: i) a aquisição de conhecimentos gerais de Microbiologia Clínica e aprendizagem e execução de metodologias utilizadas diariamente no processamento das diferentes amostras biológicas. Desta forma, possibilita adquirir a capacidade de: ii) integrar a rotina de funcionamento do laboratório; iii) compreender e realizar o tratamento adequado após a receção das diferentes amostras; iv) compreender e realizar as diferentes metodologias utilizadas durante o seu estudo, contribuindo assim para a identificação dos agentes infecciosos; v) compreender os resultados obtidos.

## **2. Diagnóstico Laboratorial em Microbiologia Clínica**

As infeções bacterianas constituem uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (1). Neste seguimento, a área da Microbiologia Clínica tem como principal função identificar os agentes etiológicos presentes nas amostras biológicas dos doentes e na maioria dos casos testar a sua suscetibilidade aos diversos antibióticos, contribuindo para um controlo das infeções na comunidade e a nível hospitalar, e para o uso responsável de antimicrobianos, de forma a evitar o surgimento de novas resistências associadas (2). Atualmente são utilizados vários critérios que permitem realizar a identificação e classificação dos agentes bacterianos, entre eles é possível destacar a sua morfologia nos meios de cultura e a nível microscópico, as técnicas de coloração que permitem realizar uma diferenciação entre eles, os requisitos necessários para o seu crescimento e os seus mecanismos de resistência característica a antimicrobianos (3).

Toda a metodologia referida, é realizada a partir de critérios de processamento definidos para cada tipo de amostra biológica colhida e posteriormente entregue no Serviço de Patologia Clínica.

## 2.1. Processamento de amostras

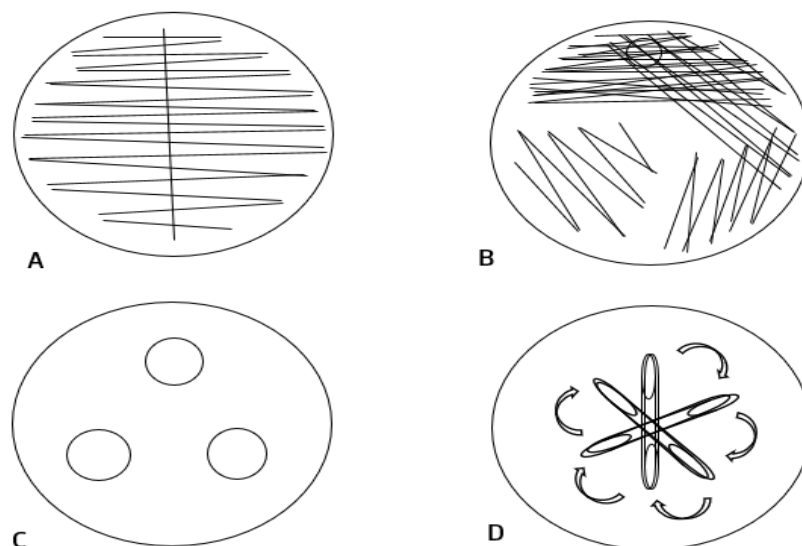
Após a receção das variadas amostras em cada setor do laboratório de Microbiologia, estas são semeadas em diferentes meios de cultura e na maioria dos casos são também realizados esfregaços posteriormente corados pelo método de Gram, de modo a auxiliar o estudo dos agentes etiológicos presentes. Os meios de cultura, o tipo de sementeira e os materiais utilizados no processamento de cada produto biológico estão descritos no Anexo 1.

### 2.1.1. Meios de cultura

Para auxiliar o isolamento e posterior estudo dos microrganismos presentes nas amostras biológicas, são utilizados diversos meios de cultura que facilitam a análise e avaliação da morfologia das colónias (4). A escolha dos meios de cultura para cada tipo de amostra é determinado consoante os agentes de interesse para o estudo e a origem da amostra, como pode ser observado no Anexo 1, assim como a definição, constituição e incubação de cada meio utilizado no laboratório de Microbiologia no Anexo 2.

### 2.1.2. Sementeiras

De forma a facilitar o isolamento e quantificação dos microrganismos presentes nas amostras biológicas em estudo, são realizados inóculos com diferentes padrões, estando estes previamente definidos para cada tipo de amostra (3).



**Figura 1**– Tipos de sementeiras utilizadas no laboratório de Microbiologia. Sementeira por: Estria (A), Quadrantes (B), Gota C) e Maki (D).

No caso da sementeira por estria (A), o processo consiste na deposição do inóculo numa estria longitudinal ao longo da zona central da placa e de seguida perpendicularmente, fazer as estrias por toda a placa como mostra a Figura 1. Esta forma possibilita a contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro (mL) e permite a visualização de colónias isoladas, facilitando assim a sua identificação (3).

A sementeira por quadrante (B), representa o tipo de sementeira mais frequentemente utilizado no laboratório, pois é utilizado na maioria das amostras. O processo consiste em depositar o inóculo numa zona marginal e de seguida fazer o seu espalhamento conforme mostra a Figura 1. Este tipo de sementeira permite estimar o número de colónias presentes na amostra original, com base no seu crescimento ao longo dos quadrantes e possibilita a visualização das colónias de forma isolada no último quadrante, facilitando assim o estudo dos agentes presentes (3).

A sementeira por gota (C), é utilizada especialmente em amostras de LCR. Com uma pipeta de Pasteur esterilizada são depositadas 3 gotas no meio, como mostra na Figura 1. Este método é utilizado com a amostra concentrada por gota, como forma de facilitar a deteção de qualquer tipo de crescimento microbiano (3).

Por fim, a sementeira de Maki (D), é a técnica utilizada no processamento de amostras de pontas de cateter. Com o auxílio de 2 ansas esterilizadas deve ser feito o rolamento do cateter 5 vezes pelo meio, como mostra na Figura 1, de modo a que seja possível identificar e quantificar as colónias presentes na amostra (5).

### **2.1.3. Colorações**

A observação microscópica é um procedimento muito importante para facilitar a identificação dos agentes presentes nas amostras em estudo (6). No laboratório de Microbiologia são utilizados três tipos diferentes de colorações, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada. A coloração e posterior observação microscópica permite o diagnóstico preliminar rápido e económico (7), através da análise morfológica, reação tintorial e agrupamentos característicos, assim como avaliar a qualidade das amostras, através da contabilização de leucócitos e de células epiteliais do hospedeiro, no caso das amostras respiratórias (8). Neste contexto, a coloração de Gram e Auramina são realizadas de forma automatizada pelo equipamento Poly Stainer, com a capacidade de corar 20 lâminas de uma só vez. A coloração por Ziehl-Neelsen é realizada manualmente.

### **2.1.3.1 Coloração de Gram**

A coloração de Gram é a técnica de diagnóstico rápido mais frequentemente utilizada, no laboratório (8), fazendo parte do procedimento preparar esfregaços para a maioria das amostras que chegam ao laboratório. Este método tem como principal objetivo diferenciar as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas (9). As bactérias Gram-positivas, possuem uma camada espessa de peptidoglicanos na sua parede celular, o que permite reter o complexo violeta cristal após a descoloração com álcool (9), apresentando uma cor roxa observada microscopicamente (10). Quanto às bactérias Gram-negativas, não têm a capacidade de reter o complexo referido anteriormente, pois o álcool tem a capacidade de romper a parede fina de peptidoglicanos, deixando-as incolores nesta fase, ficando apenas coradas posteriormente pela safranina (9), com uma cor vermelha observada ao microscópio (10). Permite ainda identificar a sua morfologia, como a frequente distinção entre cocos e bacilos, apesar da existência de outras formas (11). A diferenciação entre bactérias Gram-negativas e positivas está exemplificada no Anexo 3. O processo de coloração automatizado realizado pelo equipamento Poly Stainer está descrito no Anexo 4.

### **2.1.3.2 Coloração por Auramina**

Esta coloração é realizada para pesquisa de micobactérias em amostras clínicas. Devido à afinidade da parede celular destas para o fluorocromo auramina, ocorre a ligação de forma não específica à maioria dos agentes com estas características (3). A observação dos esfregaços da amostra descontaminada com esta coloração, é realizada através de microscopia de fluorescência, onde as células coradas por auramina ficam com uma cor amarela/laranja, contra o fundo escuro esverdeado como observado no Anexo 5 (3), permitindo assim um rápido diagnóstico inicial para o doente, sendo que para um resultado definitivo, é necessário ter em conta os vários testes realizados para a deteção destes agentes. O procedimento para a coloração de auramina realizado pelo equipamento Poly Stainer está descrito no Anexo 6.

### **2.1.3.3 Coloração de Ziehl-Neelsen**

A coloração de Ziehl-Neelsen tem a capacidade de diferenciar *Mycobacterium spp.* (agentes álcool-ácido resistentes), com uma cor avermelhada dos restantes produtos de cor azul, como é possível observar no Anexo 7 (3). Esta coloração é utilizada para a deteção de bactérias que possuem ácidos micólicos na sua parede celular, tornando-as resistentes à descoloração com álcool-ácido, o que provoca a retenção da fucsina e os restantes agentes ficam posteriormente corados por azul metileno (12). A visualização de bacilos álcool-ácido resistentes nas amostras clínicas antes de serem descontaminadas, é considerada uma evidência presuntiva de tuberculose, pois a coloração não é específica para *Mycobacterium tuberculosis* (3). O procedimento executado manualmente está definido no Anexo 8, sendo este é realizado no laboratório de Microbiologia, apenas quando pedido pelo clínico.

## 2.2. Amostras biológicas

### 2.2.1. Urina

O exame bacteriológico de urina consiste na identificação, quantificação e estudo da sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos presentes na amostra. A valorização dos resultados é dada tendo em conta vários fatores estabelecidos, como a quantificação de colónias observadas no meio, o método e a qualidade da colheita, a situação clínica do doente, a idade, se está a ser tratado com antibióticos e a observação dos resultados dos exames químicos e de sedimento da mesma amostra, entre outros (13).

Entre os agentes mais comumente responsáveis por infeções urinárias, tem destaque a *Escherichia coli* (*E.coli*), sendo esta responsável por mais de 80% das infeções adquiridas no trato urinário (14). As espécies de *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* são também agentes comuns identificados nas amostras de urina, com destaque para os doentes internados ou com fatores de risco associados, como a cateterização e patologias associadas ao aparelho urinário (15). Em caso de doentes sobre terapêutica antibiótica, os agentes mais comuns são fungos, com destaque para *Candida albicans* (15).

O meio de cultura de eleição utilizado no laboratório de Microbiologia para a análise de amostras de urina é o Uriselect™4, o qual permite uma diferenciação cromogénea dos agentes presentes na amostra, facilitando assim a sua identificação (16).

### 2.2.2. Fezes

As fezes possuem uma grande quantidade de bactérias, que fazem parte do microbioma natural do intestino, entre elas podemos destacar as espécies de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Candida* (17). Por rotina no laboratório de Microbiologia, são pesquisados os agentes *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *E.coli O157:H7* enterohemorrágica, *Yersinia spp*. e *Campylobacter spp*. sendo estes os principais organismos responsáveis por milhões de casos de doenças graves do trato gastrointestinal, associados a graves complicações (18,19).

Devido ao grande número de bactérias presentes nas amostras, estas são semeadas em meios de cultura seletivos e diferenciais, de modo a facilitar a deteção dos agentes patogénicos de interesse, pelo que os meios sólidos mais frequentemente utilizados são Hektoen, Salmonella-Shigella (SS), Novobiocina-Irgasan-Cefsulodina (CIN), Agar Campylobacter, Agar de MacConkey com Sorbitol (SMAC) e o meio líquido de enriquecimento utilizado é o Selenito.

Para observar se existe um desequilíbrio da normal flora fecal e a presença de leucócitos, fator indicativo de infecção, é realizada coloração de Gram do esfregaço das amostras (3).

Por outro lado, a pesquisa de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases em exsudados retais é um teste realizado frequentemente em pacientes, como forma de controlo da sua disseminação (20), estando esta associada a hospitalizações e a cuidados de saúde prolongados (21). Estes agentes são multirresistentes a antimicrobianos de largo espectro, dificultando assim o seu tratamento (20). Para este estudo é utilizado o meio seletivo cromogénico CHROMID® CARBA SMART Agar, possibilitando assim a fácil e rápida deteção dos microrganismos em estudo.

### **2.2.3. Exsudados genitais**

Entre as amostras de exsudados genitais recebidos no laboratório, é possível distinguir três tipos diferentes de estudos. Nas grávidas, entre as 35 e a 37 semanas de gestação, é realizada a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (grupo B de *Lancefield*) em exsudados vaginais/retais, como forma de prevenção (21). Este estudo tem uma grande importância, pois as infeções causadas por este agente são a principal causa de infeções bacterianas neonatais de alto risco, sendo uma das maiores causas de morbilidade e mortalidade neonatal em todo o mundo, tendo a capacidade de desenvolver graves problemas ao recém nascido, como pneumonia, infeção sanguínea e meningite devido ao contacto prolongado deste com o agente, durante a passagem pelo canal vaginal no parto (21). Para este estudo, a inoculação da zaragatoa é realizada no meio líquido de enriquecimento Todd Hewitt durante 24 horas e de seguida a amostra é semeada no meio sólido cromogénico, Granada, que permite a fácil deteção de colónias suspeitas.

Para o diagnóstico de infeções do aparelho genital, através de exsudados genitais, são pesquisados por rotina os microrganismos etiológicos mais comuns, como *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae* e fungos, com maior destaque para *Candida albicans* (3). Para o estudo destes agentes, são utilizados os meios de cultura VCAT, Chocolate, Granada e Sabouraud, permitindo assim uma mais fácil deteção dos agentes referidos. A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* é realizada por métodos de Biologia Molecular, por pesquisa orientada pelo clínico, assim como a pesquisa de *Ureaplasma spp* e *Mycoplasma hominis* realizada através da galeria API MYCOPLASMA IST2 que permitem identificar, enumerar e testar a suscetibilidade aos antimicrobianos.

#### 2.2.4. Hemoculturas

Todas as amostras de sangue que chegam ao laboratório para análise bacteriológica, vêm previamente inoculadas em frascos de hemocultura para serem introduzidos diretamente no equipamento Bactec™9000. Cada frasco contém corantes e um sensor químico no fundo capaz de emitir fluorescência de forma proporcional à quantidade de CO<sub>2</sub> produzido na amostra. No caso da amostra ter crescimento microbiano, os níveis de CO<sub>2</sub> vão aumentando gradualmente devido ao metabolismo bacteriano, o que provocará uma reação com os corantes no fundo da garrafa e conseqüentemente um aumento gradual dos níveis de fluorescência emitidos pelo sensor (22). O equipamento monitoriza os níveis de fluorescência a cada 10 minutos, sendo que caso atinja os níveis limite previamente estipulados, sinaliza o resultado como positivo, o que indica uma presença presuntiva de microrganismos viáveis na amostra (22).

É possível utilizar 4 tipos diferentes de garrafas no equipamento, uma delas específica para a pesquisa de organismos aeróbios, outra para anaeróbios, outra para fungos e leveduras e outra para uso em amostras pediátricas. Todas elas devem conter uma amostra de sangue entre 8 a 10 mL, sendo que para a pediátrica são apenas necessários entre 3 a 5 mL (23).

O sangue é um produto naturalmente estéril, sendo que, caso a amostra seja dada como positiva pelo equipamento, esta deve ser repicada para os meios de cultura descritos no Anexo 1. Qualquer crescimento observado nos meios de cultura, deverá ser estudado com o objetivo de identificar o agente etiológico da infecção e realizar um estudo da sua suscetibilidade aos antimicrobianos (5).

Os agentes etiológicos mais comuns encontrados em amostras de bebês são: *E.coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Listeria monocytogenes* (24). Nas restantes idades, os mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *E. coli* (25).

No laboratório são também processadas pontas de catéter em meio de Gelose Sangue, com o objetivo de avaliar a existência de microrganismos e detetar a possível origem da infecção (5). A amostra é valorizada, quando estão presentes mais de 15 colônias do mesmo agente, sendo que os resultados desta análise para serem interpretados, devem ser correlacionados com os resultados da hemocultura do doente (5).

### **2.2.5. Produtos respiratórios superiores**

Relativamente às amostras do trato respiratório superior, processam-se exsudados:

Nasais, para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes (MRSA). A resistência antimicrobiana é um grande problema de saúde em todo o mundo (26). O surgimento de MRSA está maioritariamente associado aos cuidados de saúde (27), sendo que este é testado como forma de despiste aos doentes tratados, assim como um possível controlo para limitar a disseminação do agente (28). A amostra é recolhida através de exsudados nasais devido a este ser o principal local de colonização do agente (29). O estudo consiste em identificar o microrganismo, através do uso de um meio cromogéneo seletivo, MRSA II, permitindo assim a fácil deteção dos agentes em estudo e posteriormente testada a sua sensibilidade aos antimicrobianos utilizados nestes casos (26).

Orofaringéos, para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes*, constituindo o tema aprofundado no Ponto 3 deste trabalho.

### **2.2.6. Produtos respiratórios inferiores**

Expetoração, aspirado brônquico, aspirado traqueal e lavado bronco-alveolar são alguns dos produtos respiratórios inferiores analisados no laboratório de Microbiologia.

A contaminação das amostras pela flora comensal da orofaringe no momento da colheita, é uma das principais dificuldades na análise destes produtos, principalmente a expectoração (3). Posto isto, é necessário avaliar a qualidade da amostra antes de realizar a análise cultural (3). A qualidade desta é avaliada através da observação da amostra numa lâmina corada pelo método de Gram, no microscópio ótico com uma ampliação de 100 vezes, sendo que para uma amostra ser considerada de boa qualidade, devem ser observadas menos de 10 células epiteliais e mais de 25 neutrófilos polimorfonucleares (3). Está exemplificado no Anexo 9, uma amostra considerada de boa e má qualidade. Para além da qualidade da amostra, é necessário ter em conta outros fatores como o normal microbioma do sistema respiratório, a predominância dos agentes observados, o estado clínico do doente, o tipo de amostra e meio de transporte, para ser possível interpretar os resultados (3).

Alguns agentes pertencentes ao normal microbioma do sistema respiratório, podem vir a ser causadores de infeções como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus* (17). As amostras respiratórias, são normalmente semeadas em meio de Gelose Sangue, Chocolate, MacConkey e meio com 5% sangue de ovelha com colistina e ácido nalidíxico (CNA), de forma a possibilitar a visualização dos agentes em estudo.

### **2.2.7. Líquidos biológicos**

O líquido cefalorraquidiano (LCR), peritoneal/ascítico, pleural, pericárdico e articular/sinovial são comumente processados no laboratório de Microbiologia.

O LCR é um produto estéril em indivíduos saudáveis, sendo que caso ocorra colonização de agentes etiológicos, é indicativo de uma infecção do sistema nervoso central (30). A rápida detecção através da coloração de Gram e a sua identificação no exame cultural complementado com o estudo da suscetibilidade do agente aos antimicrobianos é crucial para a sobrevivência do doente e para a minimização de eventuais sequelas (31). O produto é considerado prioritário e, como tal, deve ser processado de imediato no momento que este chega ao laboratório, de forma a possibilitar a detecção rápida dos agentes microbianos ainda viáveis na amostra (17). Os microrganismos mais comuns encontrados em amostras de LCR são *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis* e *Cryptococcus neoformans* (32). O produto é semeado em meio de Gelose Sangue, Chocolate e por vezes em meio Sabouraud (quando solicitada a pesquisa de fungos), de forma a permitir o crescimento e visualização de qualquer tipo de microrganismo presentes na amostra.

No que diz respeito aos restantes líquidos biológicos processados, deve ser tido em conta a origem do produto e a história clínica do doente, de forma a permitir um correto diagnóstico e uma indicação adequada quanto à terapêutica possível para cada doente (3,5). Estes produtos são semeados conforme as suas características, descritas no Anexo 1.

### **2.2.8. Tecidos e exsudados de feridas**

Em procedimentos mais invasivos, como biópsias ou cirurgias, muitas vezes são colhidas amostras de tecido, geralmente obtidos de forma asséptica, o que neste caso facilita o exame, pois qualquer crescimento microbiano deve ser valorizado e posteriormente estudado (5). No entanto, no caso de amostras provenientes de locais mais superficiais ou os exsudados de feridas, é normal ocorrer um crescimento polimicrobiano, devido à flora comensal. Nestes casos, é necessário ter em consideração o exame direto corado por Gram, a história clínica do doente, o local da infecção, o método de colheita, o tipo de transporte e o tipo de microrganismos isolados, de forma a permitir um correto diagnóstico e uma indicação adequada quanto à terapêutica possível para cada doente. (3) Os meios de cultura utilizados para estes produtos são Gelose Sangue, Chocolate, CNA, MacConkey, Brucella e Caldo de Carne.

### **2.3. Testes imunocromatográficos**

Os testes rápidos utilizados no laboratório de Microbiologia baseiam-se no princípio imunocromatográfico para a deteção qualitativa do agente em estudo.

Este princípio funciona através da difusão de anticorpos desidratados na tira do teste. Durante o procedimento, a amostra reage com os anticorpos presentes no teste e caso os antígenos do agente estejam presentes na amostra, há a ligação do complexo anticorpo/antígeno, formando um conjugado colorido que resulta numa banda de cor, dando assim um resultado positivo. No caso da amostra ser negativa para a presença do agente, não há a ligação do complexo antígeno/anticorpo, logo não aparece a linha na zona do teste. A linha do controlo aparece nos testes válidos independentemente do resultado, como forma de controlo que permite verificar se o volume da amostra é suficiente, se a migração foi realizada de forma correta e como controlo interno dos reagentes. No caso da linha do controlo não surgir, o resultado é dado como inválido e deverá ser repetido o procedimento num novo teste (33). Os resultados possíveis obtidos num teste rápido imunocromatográfico estão demonstrados no Anexo 10.

O procedimento baseia-se na mistura da amostra com o tampão fornecido em cada embalagem do teste, homogeneização da suspensão, deposição desta no poço do teste e leitura do resultado. É importante referir que a quantidade de amostra e de tampão utilizados na mistura, a quantidade de suspensão introduzida no poço e o tempo de espera até ler o resultado, varia entre cada teste, estando descritos no respetivo boletim informativo fornecidos em cada embalagem de testes. O Anexo 11 indica os testes rápidos imunocromatográficos utilizados no laboratório de Microbiologia, em cada tipo de amostra.

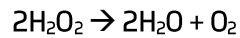
### **2.4. Testes de identificação presuntivos**

Vários tipos de testes de fácil e rápida execução, são utilizados no laboratório de Microbiologia, como forma de auxiliar o processo de identificação dos agentes em estudo (3).

#### **2.4.1. Catalase**

O teste da catalase permite diferenciar bactérias Gram-positivas. É utilizada uma lâmina, uma ansa esterilizada e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). O procedimento baseia-se na colocação de uma gota de água oxigenada na lâmina e de seguida com a ansa, é mergulhada uma colónia. A catalase é considerada positiva quando há a emissão de bolhas de oxigénio pela colónia quando mergulhada, caso não haja efervescência, é considerado um resultado negativo (3), como exemplificado no Anexo 12.

O princípio baseia-se no caso das reações positivas, da enzima catalase presente nos microrganismos, desdobrar o peróxido de hidrogénio ( $2\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigénio ( $\text{O}_2$ ). Caso a amostra não tenha a enzima presente, a reação não é desencadeada (3).



Entre os organismos catalase positivos, podemos destacar *Staphylococcus spp*, *Listeria monocytogenes* e *Corynebacterium*, nos organismos catalase negativos são maioritariamente organismos *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.* (3).

### 2.4.2. Coagulase

O teste da coagulase permite fazer uma distinção instantânea entre *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) dos restantes *Staphylococcus*, comumente denominados de *Staphylococcus* coagulase negativa. O reagente é constituído por um fator de aglutinação, que quando se liga ao fibrinogénio da parede celular do agente, causando a aglutinação das células (no caso do agente ser *Staphylococcus aureus*) (3). O procedimento baseia-se na colocação de uma gota de reagente Pastorex™ Staph-plus, Bio-Rad, numa cartolina específica, de seguida com uma ansa esterilizada deve ser dispensada uma colónia sobre o reagente e misturar. O resultado é considerado positivo quando há a formação de agregados, caso estes não sejam visíveis, o resultado é considerado negativo (3). A exemplificação dos resultados pode ser observada no Anexo 14.

Este teste também pode ser realizado por outra metodologia- **Coagulase em tubo** – que apesar de partilhar o mesmo objetivo, utiliza um procedimento diferente (3).

Este tipo de teste tem um resultado mais demorado em comparação com o anterior, sendo que é utilizado em laboratório na maioria das vezes como forma de confirmação, em caso de dúvidas. O procedimento consiste em suspender 2 colónias do agente em estudo num tubo de acrílico, com o auxílio de uma zaragatoa, em 1ml de plasma em citrato de um doente com estudo de coagulação normal. A suspensão é colocada numa estufa a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo que a sua leitura deve ser feita após 4 horas e novamente após as 24 horas de incubação (3). Caso haja a formação de coágulos no plasma, é considerada coagulase positiva, se não houver formação de agregados, o resultado é considerado negativo (3).

### 2.4.3. Oxidase

O teste da oxidase é utilizado principalmente para diferenciar os microrganismos Gram-negativos, através da presença ou ausência de atividade do citocromo c oxidase (3).

O procedimento baseia-se na deposição de uma colónia isolada no filtro impregnado com o reagente (Dryslide), utilizando uma ansa esterilizada. Se nos primeiros 20 segundos, for visível a modificação da cor do filtro para azul, então considera-se um resultado positivo, se não se verificar alteração da cor, é considerado um resultado negativo (3), como exemplificado no Anexo 13.

*Enterobactereaceae* e *Acinetobacter spp.* são organismos conhecidos com oxidase negativa. Por outro lado *Pseudomonas spp.* e *Aeromonas spp.* são organismos com uma reação de oxidase positiva (3).

### 2.4.4. Indol

O teste do indol baseia-se no princípio de que os organismos que produzem a enzima triptofanase, têm a capacidade de degradar o triptofano em ácido pirúvico, amónia e indol. É um processo especialmente utilizado em *Enterobactériase* permite a identificação presuntiva de *E.coli*, que possui uma reação positiva (3). O procedimento baseia-se na colocação dos discos de papel impregnados com o reagente em cima de uma lâmina de vidro e depois com uma ansa esterilizada é colocada a colónia a testar. Se se verificar o aparecimento da cor azul de imediato no local, é considerada uma reação positiva, ou seja, significa que o agente testado tem a capacidade de degradar a enzima triptofanase, pois é detetada a produção de indol. No caso de não haver alteração da cor, o resultado é considerado negativo (3).

### 2.4.5. Prova de Filamentação

Este teste é realizado com o objetivo de diferenciar *Candida albicans* de outras leveduras (6). O procedimento consiste em suspender num tubo de acrílico 2 colónias do agente em estudo em 1mL de soro de um doente, sendo que o ideal é ser soro de um doente glicosilado, de forma a estimular o crescimento do agente. A mistura deve ser colocada na estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante cerca de 2 horas e ser visualizada de seguida ao microscópio (6). No caso de haver crescimento dos filamentos sem constrição, a amostra é dada como positiva para a identificação presuntiva de *Candida albicans*. Caso haja crescimento de filamentos com constrição, a amostra é dada como negativa para a presença de *Candida albicans*, o que significa que é necessário continuar o estudo, de forma a ser possível identificar o agente presente na amostra (6).

#### **2.4.6. Teste dos Fatores de Crescimento X e V**

Este teste é realizado com o objetivo de diferenciar *Haemophilus spp.* Algumas espécies requerem unicamente para o seu crescimento do fator X (hemina), outros do fator V (NAD- dinucleótido de nicotinamida adenina), e noutros casos necessitam dos dois fatores em simultâneo (V + X) para se desenvolverem. Permitindo assim realizar uma identificação presuntiva do agente em estudo através do seu crescimento em torno dos fatores utilizados (3). O procedimento é idêntico ao do método da difusão em disco explicado no ponto 2.7.2, sendo que os discos devem ter um afastamento entre eles de cerca de 2 cm (3), conforme exemplificado no Anexo 15.

#### **2.5. Teste rápido de aglutinação para *Streptococcus* do Grupo de *Lancefield* A, B, C, D, F e G**

Este teste rápido é utilizado para identificar a presença de estreptococos do grupo de *Lancefield* em colónias com uma aparência característica destes agentes. Possui na embalagem de teste enzimas extratoras que permitem preparar a amostra para o teste e um reagente com anticorpos específicos para cada um dos grupos de *Lancefield*, com o objetivo de identificar a qual deles pertence o agente em estudo (34).

O grupo de *Lancefield* é constituído por seis grupos de estreptococos, que foram agrupados serologicamente com base nos antígenos presentes na parede celular dos seus carboidratos. Este sistema de classificação é muito utilizado em laboratório, pois para além destes agentes fazerem parte do normal microbioma do humano, em alguns casos, por exemplo, aquando do aumento dos fatores de virulência ou quando a imunidade é prejudicada, estes organismos podem levar à formação de infeções graves (3). O procedimento deve ser realizado, conforme descrito no boletim informativo da casa comercial (34), descrito no Anexo 16.

Para observar o resultado do teste, caso tenha ocorrido a ligação do complexo anticorpo/antígeno, as partículas presentes na suspensão agregam-se, dando o aspeto de aglutinação, o que significa que tem presente na amostra o agente correspondente ao grupo testado nesse círculo, dando assim um resultado positivo para o agente específico (34), como exemplificado na Figura 2. No caso de não haver a ligação do complexo, não há formação de agregados, o que significa que na amostra não há a presença de estreptococos do grupo de *Lancefield*, ou seja, corresponde a um resultado negativo para os grupos testados (34).



*Figura 2- Teste rápido de aglutinação para identificação de Streptococcus do Grupo de Lancefield. Na imagem está representado um resultado positivo para a presença de Streptococcus pyogenes (Grupo A de Lancefield), presente no círculo 1, onde é visível a formação de agregados.*

## **2.6. Identificação de microrganismos**

### **2.6.1. Sistema automatizado**

Atualmente no laboratório de Microbiologia, o sistema automatizado para a identificação de microrganismos é realizado pelo equipamento MicroScan WalkAway, Beckam Coulter.

São utilizados painéis de microtitulação com 64 poços, que para além dos controlos de crescimento, cada um destes possui metabolitos e antibióticos, que são posteriormente hidratados com uma solução inoculada com o agente em estudo, permitindo assim através do cálculo do crescimento do agente em cada poço e de um algoritmo previamente definido, determinar as várias sensibilidades assim como a sua identificação (35). A distinção entre os vários painéis utilizados está explicada no Anexo 17 e o procedimento descrito no Anexo 18.

### **2.6.2. Galerias API**

O sistema API permite realizar a identificação bioquímica das bactérias em estudo, decorrente e em associação com outros itens como a coloração de Gram, o aspeto das colónias, o teste da oxidase, catalase, coagulase, de modo a efetuar uma identificação completa (36). O princípio baseia-se numa galeria com microtúbulos que contém substratos desidratados, estes são inoculados com uma suspensão bacteriana, que durante o tempo de incubação traduzem-se por viragens de cor espontâneas (36). A

leitura destas reações é realizada em alguns casos com a adição de reagentes, para promover a mudança de cor e posteriormente fazer a leitura do mesmo. Por fim, é obtido o código correspondente do agente presente, assim como a percentagem de identificação presente no catálogo analítico disponível na plataforma online apiweb™ (36).

Nos laboratórios de Microbiologia do HSS estão disponíveis: o API 20 E para a identificação de bacilos Gram negativos; API 20 NE para bacilos Gram negativos não entéricos; API 20 Strep para estreptococos e bactérias associadas; API 20 A para bactérias anaeróbias; API Coryne para a identificação de bactérias do género *Corynebacterium*; API NH para a identificação de *Neisseria* e *Haemophilus*; API Campy para identificação de *Campylobacter spp* e a galeria MYCOPLASMA IST 2 para identificação, enumeração e teste de suscetibilidade de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp.* (36).

## **2.7. Antibiogramas**

### **2.7.1. Sistema automatizado**

Atualmente no laboratório de Microbiologia, os antibiogramas para cada agente em estudo são realizados pelo equipamento MicroScan WalkAway, Beckam Coulter. Consiste num sistema automatizado que, para além da sua identificação anteriormente referida, permite testar a suscetibilidade a vários antimicrobianos para o mesmo microrganismo (35). O princípio está descrito no ponto 2.6.1 deste trabalho.

### **2.7.2. Método de difusão em disco**

Este teste é realizado através da medição dos halos de sensibilidade em torno dos discos impregnados com antibiótico. Através de valores padronizados, esta medição permite obter os resultados qualitativos quanto à resistência do agente aos antimicrobianos testados como: sensível, intermédio e resistente (5). Os discos são os métodos mais utilizados em laboratório atualmente, pois possuem uma técnica simples, valores padronizados, são mais baratos e permitem testar vários antimicrobianos para o mesmo agente, na mesma placa (3). O procedimento utilizado está descrito no Anexo 19, assim como a sua metodologia exemplificada no Anexo 20.

### 2.7.3. Gradiente de concentração

O procedimento para a realização deste teste, é igual ao descrito anteriormente, no método de difusão em disco. No entanto, em vez de discos, são utilizadas tiras de papel impregnadas com concentrações seriadas do antibiótico a ser testado (5). A mais baixa concentração de antimicrobiano que impede o crescimento bacteriano, corresponde à Concentração Mínima Inibitória (MIC) (5).

### 2.8. Pesquisa de anaeróbios

Grande parte das infecções causadas por bactérias anaeróbias são endógenas e polimicrobianas, podendo originar vários tipos de infecções, com uma prevalência muito variável. O diagnóstico laboratorial destes agentes baseia-se: na qualidade das amostras (deve ser idealmente colhida por aspiração ou biópsia, de modo a evitar contaminações pela flora comensal); na rapidez do seu transporte, de forma a garantir a viabilidade das bactérias; e os procedimentos laboratoriais utilizados (5). Todos os produtos com pesquisa de organismos anaeróbios são semeados em placas com meio de Brucella e incubados numa estufa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com presença de  $\text{CO}_2$  em atmosfera anaeróbia durante cerca de 48 horas.

### 2.9. Pesquisa de micobactérias

O processamento deste tipo de amostras é realizado no laboratório III de Microbiologia, onde é necessário manter rigorosos critérios de segurança.

*Mycobacterium tuberculosis* é o agente mais comum do *Mycobacterium tuberculosis* Complex, causador de Tuberculose, conhecido por se tornar um dos agentes patogénicos mais mortais, responsável por cerca de 1,7 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2016 (37). A capacidade de transmissão destas bactérias depende de variados fatores, no entanto os indivíduos com tuberculose pulmonar possuem uma maior capacidade de transmissão para a comunidade via gotículas respiratórias, através de tosse e espirros (12). Para além dos pulmões, este agente tem a capacidade de se disseminar por todo o organismo (38), daí a razão pela qual é realizado este estudo em vários tipos de amostras biológicas, enumeradas no Anexo 21.

O processamento de todas as amostras para pesquisa de *Mycobacterium spp.* consiste na sua descontaminação, concentração e posterior inoculação da mistura em meio de cultura Lowenstein-Jensen, um tubo MGIT (introduzido no equipamento Bactec MGIT™ 320 com o mesmo método de deteção de crescimento bacteriano realizados no instrumento Bactec™ 9000 nas hemoculturas) e são também realizados dois esfregaços, um para posterior coloração por Auramina e outro para reservar. O processo de descontaminação, concentração e inoculação das amostras está descrito no Anexo 22.

O processo para obtenção do resultado definitivo é muito longo, pois os meios de cultura devem incubar durante 8 semanas e o MGIT durante 6 semanas, daí a importância dos exames rápidos de diagnóstico presuntivo através da coloração por Auramina e de Ziehl-Neelsen para esta etiologia.

### **3. Amigdalite estreptocócica: casuística de uma urgência pediátrica**

#### **3.1. Contextualização**

No laboratório II de Microbiologia do HSS, são processadas amostras de exsudados da orofaringe, para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de *Lancefield*), sendo a grande maioria destas provenientes do Serviço de Urgência Pediátrica, geralmente associadas a queixas de dor de garganta e amigdalites.

##### **3.1.1. Amigdalite**

A dor de garganta constitui a causa mais comum de queixa em serviços de urgência pediátrica, com cerca de 5% dos casos, sendo a faringite e amigdalite as principais causas reconhecidas (39).

A amigdalite consiste numa inflamação da garganta, que provoca dores e inchaço no local, acompanhado de uma mucosa avermelhada (17). Para além destes sintomas, rouquidão, febre, dor de cabeça, náuseas, secreções em ferida nas amígdalas e arrepios podem também estar associados (17,40). Como é difícil distinguir o agente originário de infeção pelo quadro clínico do doente, é necessário através de testes laboratoriais distinguir as amigdalites de origem bacteriana, das de origem viral, como forma de orientar a terapêutica (41). Entre as amigdalites virais, os principais agentes causadores de infeção são adenovírus, coronavírus, EBV, HIV e influenza (3).

*Streptococcus pyogenes* é considerado o principal agente causador de amigdalites bacterianas (42). Para além de *Streptococcus* do grupo A, os agentes bacterianos etiológicos mais comuns, causadores de infeções da orofaringe são *Corynebacterium diphtheriae*, *Fusobacterium necrophorum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Treponema pallidum*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* e *Mycoplasma pneumoniae* (40).

### 3.1.2. Amigdalite estreptocócica

A amigdalite estreptocócica tem como principal agente causal *Streptococcus* do Grupo A de *Lancefield* (SGA) (43), sendo que em alguns casos é possível serem também isolados *Streptococcus* do grupo C e G de *Lancefield* (*Streptococcus dysgalacteae subsp. equisimilis*) (41,42). Estes organismos são idênticos aos SGA microbiologicamente, epidemiologicamente e o seu tratamento também tem como base a penicilina (44).

É estimado que por ano, em todo o mundo, ocorram cerca de 616 milhões de casos de amigdalites causadas por SGA (45), representando cerca de 20% a 30% das crianças que se deslocam às urgências com queixas de dores de garganta (41,46,47) e cerca de 5 a 10% nos adultos (46,48)

Para além da dor de garganta, os sintomas mais prevalentes associados a esta etiologia são lesões supurativas na orofaringe, secreções nasais, hipertrofia das amígdalas e febre, sendo que nenhuma destas características é exclusiva de amigdalite estreptocócica (41,43,47). Por esse motivo, a realização dos testes laboratoriais para confirmação do diagnóstico têm uma grande importância, pois permitem detetar a origem do agente provocador da infeção, possibilitando assim uma terapêutica adequada para cada caso (41).

Quanto ao sexo, foram encontrados diversos artigos que mostram uma maior prevalência no sexo masculino (49,50) e outros com uma maior prevalência no sexo feminino (46,51), sendo que em nenhum dos casos é observada uma diferença significativa entre eles.

Nos países desenvolvidos, a população mais afetada centra-se nas crianças e adolescentes em idade escolar (41,42,46,47,50) sendo que está descrita uma maior proliferação do agente nos mais novos que frequentam creches, jardins de infância e escolas, pois são locais geralmente fechados e com grandes contactos, permitindo assim a rápida disseminação do agente (52,53), dado que a transmissão de SGA é realizada maioritariamente no contacto entre pessoas, através de gotículas nasais e de saliva (47,49). Durante os meses de verão é observada uma diminuição no surgimento de novos casos de infeção (42,47,50,51,54–56).

### 3.1.3. *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes*, denominado em 1884 (pyo = pus) e (genes = em formação), após ser identificada a sua relação com reações supurativas (57).

Também conhecido como *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do Grupo A de *Lancefield*, é um coco Gram positivo em forma de cadeia (58). A sua capacidade de formação de um halo de  $\beta$ -hemólise em torno das colónias, é visível nos meios de cultura que contêm sangue, facilitando assim a sua deteção nos métodos de diagnóstico culturais (3).

## **Epidemiologia**

Durante o século XX, a sua incidência teve uma grande redução nos países mais desenvolvidos, devido à melhoria das condições de vida. No entanto, nos últimos anos tem vindo a aumentar devido à ocorrência de alterações genéticas do agente, permitindo assim que este se continue a disseminar globalmente (59). Um estudo realizado em 2005 confirmou que este agente é responsável por cerca de 1,78 milhões de novos casos de infeções no mundo, que resultam em cerca de 500 mil mortes por ano (45). Sendo prevalente nos países em desenvolvimento e de baixo nível socioeconómico (49), é um dos dez agentes causadores de maior taxa de mortalidade em idade pediátrica (60).

Considerando que o SGA tem a capacidade de colonizar diferentes zonas do corpo humano (42), na maioria dos casos, a infeção tem início na orofaringe ou na pele, sendo que a gravidade das lesões pode ser desde moderada como a amigdalite, mais grave como a febre reumática, escarlatina, pneumonia, bacteremia, erisipela, celulite, glomerulonefrite pós-estreptocócica, artrite, desordem autoimune neurofisiológica pediátrica e até situações de risco de vida como o síndrome de choque tóxico e fascíte necrotizante (58). Em contrapartida, em alguns casos, é também possível isolar SGA no microbioma de indivíduos saudáveis, comprovando assim que este agente pode estar presente em indivíduos assintomáticos (61).

## **Transmissão**

A sua transmissão ocorre por contacto direto entre pessoas e contacto com secreções do trato respiratório ou superfícies infetadas (49), sendo também já descritas cadeias de transmissão através de comida contaminada (62). Para além destes, é também possível referir as contaminações hospitalares e noutras instituições prestadoras de cuidados de saúde, como importantes veículos de disseminação, através de superfícies infetadas, profissionais de saúde, de outros trabalhadores dos referidos locais ou até entre os próprios doentes (63).

## **Grupos de risco**

SGA é patogénico apenas para o Homem (64), sendo as crianças e adolescentes a população mais afetada (65). Para além das crianças, indivíduos imunodeprimidos, com comorbidades e idosos são também considerados grupos de risco para possíveis complicações em casos de infeção (66).

## **Tratamento**

O tratamento deve ser iniciado o mais rapidamente possível, de modo a prevenir o desenvolvimento da infeção e outras possíveis complicações (67). O antibiótico de eleição é a penicilina, pois a maioria dos SGA isolados são sensíveis a este antimicrobiano, complementado com o baixo custo do mesmo (68).

### 3.2. Objetivos do projeto

Este projeto tem como objetivos, adquirir e aprofundar conhecimentos, e pela análise estatística dos dados obtidos: i) realizar uma análise comparativa entre as percentagens de casos positivos e negativos dos exames culturais durante os anos de 2019 e 2020, segundo o sexo, faixa etária e mês da ocorrência com a prevalência da infeção; e ii) realizar uma análise comparativa entre o resultado do diagnóstico do teste rápido imunocromatográfico e do teste cultural.

Este estudo tem a finalidade de determinar a eficácia dos testes imunocromatográficos em relação aos testes culturais realizados, como forma de obtenção de um diagnóstico e instituição de um tratamento célere e adequado para o doente.

### 3.3. Metodologia

Este estudo do tipo observacional analítico transversal, teve por base a recolha dos resultados dos testes realizados (cultural e rápido imunocromatográfico) e dos registos dos doentes (sexo, idade e data da ocorrência) que foram atendidos no Serviço de Urgência Pediátrica do HSS durante os anos de 2019 e 2020, aos quais foi realizada uma colheita de exsudado orofaríngeo, para pesquisa de SGA. A execução do projeto baseia-se no tratamento e análise de dados estatísticos, no entanto, apesar de não ter participado no processamento das amostras estudadas, toda a metodologia utilizada no processo faz parte do estágio prático realizado no laboratório de Microbiologia.

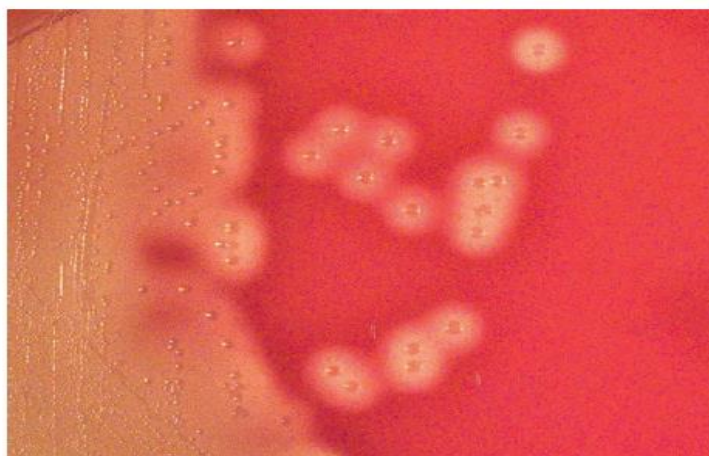
A colheita das amostras obedeceu ao procedimento *standardizado* em vigor na instituição, sendo realizada por uma zaragatoa estéril com extremidades de Dacron ou Rayon e com hastes de plástico, tocando na zona da faringe posterior, amígdalas e nas zonas inflamadas (41), sendo que deve ser evitado tocar nos dentes, língua e bochechas, de modo a prevenir o excesso de muco resultando em possíveis interferências no resultado do teste imunocromatográfico (69).

Atualmente, o procedimento para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes* no laboratório de Microbiologia consiste na realização de dois tipos de testes qualitativos. O teste cultural com um tempo mínimo de resposta de 48 horas e o teste rápido imunocromatográfico, o qual permitem fornecer uma resposta ao clínico no máximo até 2 horas após a receção da amostra no laboratório.

### 3.3.1. Processamento do exame cultural

No processamento do exsudado orofaríngeo para a realização do teste cultural, a primeira etapa consiste em realizar o inóculo com a zaragatoa numa placa com meio de CNA, com o auxílio de uma ansa de 10 $\mu$ L. Nesta etapa, é realizada uma sementeira por quadrantes, como exemplificado na figura 1B do ponto 2.1.2. De seguida, a placa deve ser incubada numa estufa a 37 $^{\circ}$ C  $\pm$  2 $^{\circ}$ C com suplemento de CO<sub>2</sub> a 5%, durante 18 a 24 horas (70), até ser possível observar crescimento microbiano.

O meio de CNA apresenta seletividade para bactérias Gram positivas, devido à presença de antibióticos com a capacidade de inibir o crescimento de Gram-negativos, permitindo o desenvolvimento dos restantes, como a colistina e o ácido nalidíxico (70), fazendo assim uma seleção de organismos com o objetivo de facilitar a observação das colónias de interesse, devido à flora polimicrobiana presente na orofaringe (71). Por outro lado, a presença de sangue de ovelha a 5% permite detetar a capacidade de produzir  $\beta$ -hemólise em torno das colónias, tornando esta uma característica de referência para a deteção de colónias suspeitas, como é possível observar na Figura 3 (3).



*Figura 3- Colónias características de Streptococcus pyogenes com halos de  $\beta$ -hemólise. Adaptado de Medical Microbiology, Murray et al. 2016.*

Após 18 a 24 horas, no caso de não serem verificadas colónias típicas, a placa deve ser novamente incubada até um total de 48 horas como forma de confirmação, se o meio continuar sem a presença de colónias sugestivas, o resultado final do teste cultural é dado como negativo (41).

Se for observado um crescimento de colónias características do agente, é realizado um isolamento deste para uma placa com meio de Gelose Sangue, em condições de incubação igual às descritas para o meio de CNA, permitindo assim uma melhor observação das colónias isoladas e a existência de cultura fresca para que o estudo seja continuado no dia seguinte.

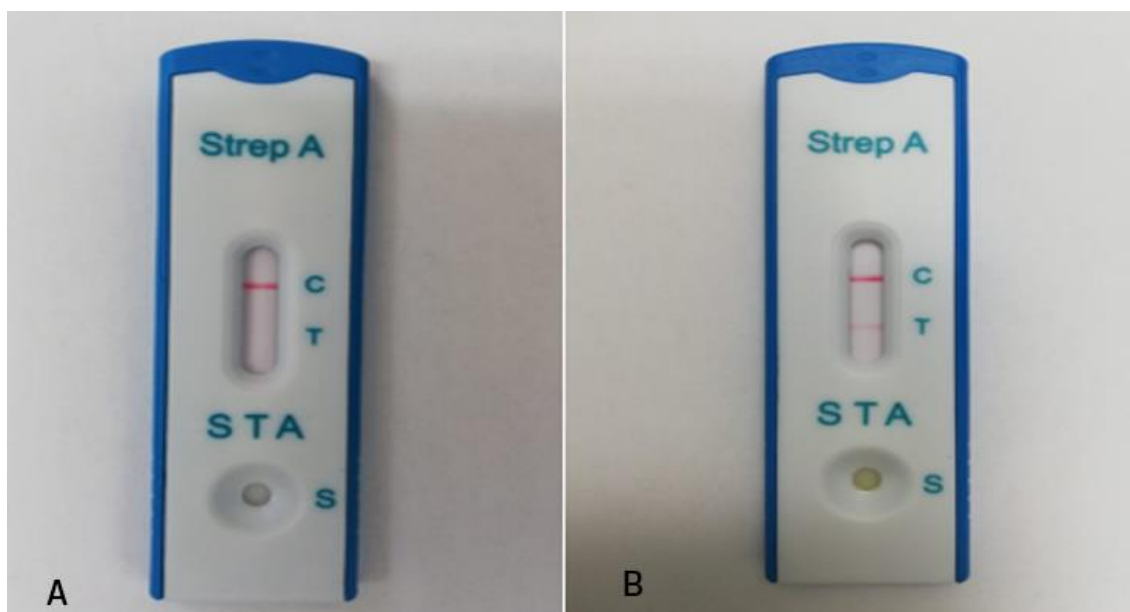
Após 24 horas de incubação desta, a forma mais frequentemente utilizada para obter a identificação específica do agente, é através da realização do Teste Rápido de Aglutinação para Streptococcus dos Grupos de Lancefield A, B, C, D, F e G, descrito no Ponto 2.5 deste trabalho. Outra forma de identificação do agente, embora menos utilizada, é através da realização de uma galeria API 20 Strep, bioMérieux, descrito anteriormente no Ponto 2.6.2 deste documento.

### 3.3.2. Processamento do teste imunocromatográfico

Os testes imunocromatográficos foram protocolados no Serviço de Patologia Clínica no dia 27 de outubro de 2019 e sinalizados como prioritários, sendo que o seu resultado deve ser introduzido no sistema informático no máximo até 2 horas após a receção da amostra no laboratório.

O procedimento consiste em colocar 8 gotas de tampão de extração no tubo descartável, fornecidos em cada embalagem de testes. De seguida, a zaragatoa deve ser agitada e pressionada no fundo do tubo, de modo a libertar o máximo de amostra possível, deixando a solução obtida a incubar durante cerca de 5 minutos, pois quanto maior o tempo de extração, maior é a probabilidade de deteção do agente (69).

Por fim são colocadas 3 gotas de solução no poço da cassette de teste e realiza-se a leitura do resultado após 5 minutos (69). A interpretação do resultado do teste deve ser realizada conforme exemplificado na Figura 4.



*Figura 4- Teste rápido imunocromatográfico utilizado para a deteção qualitativa de Streptococcus pyogenes, BIOSYNEX ®. Na imagem A está representado um teste com resultado válido negativo, com a presença de uma banda de cor no local do controlo (C) e nenhuma banda no local do teste (T). Na imagem B está representado um resultado válido positivo, com a presença de uma banda de cor na zona do controlo e uma segunda banda na zona do teste.*

### 3.3.3. Análise estatística

O teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para a realização do cálculo inferencial na comparação da percentagem de positivos entre 2019 e 2020, sobre o sexo, faixa etária, mês da ocorrência da infeção e para comparação entre os resultados dos testes culturais e imunocromatográficos. Os parâmetros sexo, faixa etária e mês de ocorrência da infeção foram selecionados com base na sua relevância clínica para a caracterização do agente. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com um nível de significância inferior a 5% ( $P < 0,05$ ). As análises descritivas e inferenciais das variáveis em estudo foram realizadas utilizando o programa IBM SPSS Statistics versão 27.

### 3.4. Resultados e discussão

#### 3.4.1. Resultados dos testes culturais nos anos 2019 e 2020

Como pode ser observado na Tabela 1, foram incluídas 661 amostras processadas durante os dois anos em estudo para a pesquisa de SGA. Verifica-se um aumento considerável no número total de testes realizados nos dois anos, nomeadamente, 2019 (n=252) e 2020 (n=409).

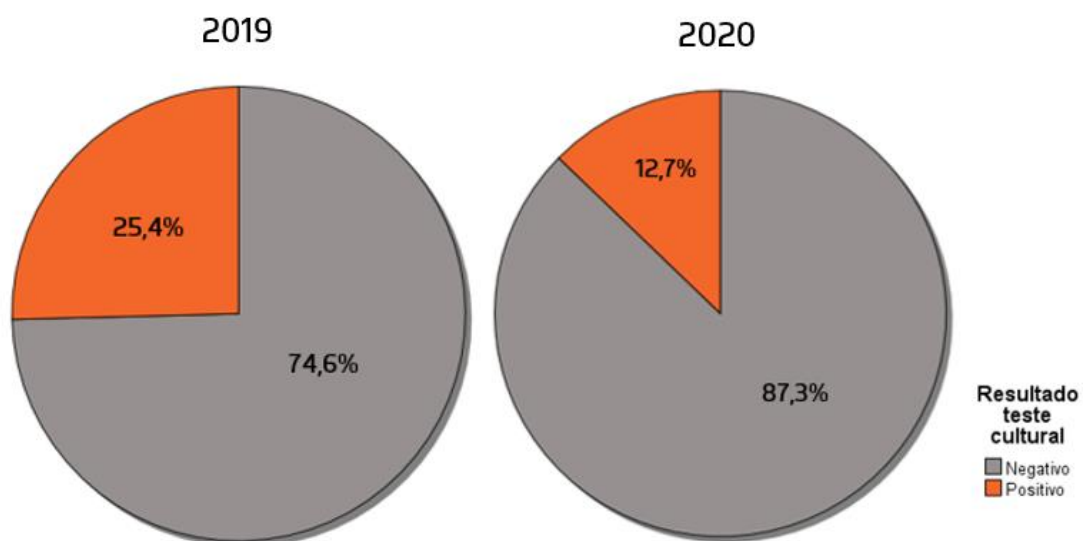
Os testes culturais continuam a ser considerados o “*Gold Standard*” para a deteção de SGA (41), estando descritos com uma sensibilidade que varia entre 90% e 95%, no entanto este valor pode variar consoante múltiplos fatores (41,72). A maior desvantagem deste tipo de metodologia é a demora na obtenção do resultado, o que se traduz numa dificuldade para os clínicos, na decisão do tipo de tratamento que deve ser prescrito em cada caso (46). O elevado número de testes pedidos no ano de 2020, em relação ao anterior, pode ser explicado devido à implementação dos testes imunocromatográficos na pesquisa de SGA no final do ano de 2019, como referido anteriormente. Os testes rápidos, permitem uma resposta célere quanto à origem do agente etiológico da infeção, auxiliando assim o clínico na decisão da terapêutica indicada para cada caso (41,46), ao contrário dos testes culturais que possuem uma resposta demorada, podendo ser assim explicado o motivo do grande aumento do número de testes solicitados.

**Tabela 1**– Resultados dos testes culturais de amostras processadas durante os anos de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.

	Positivo	Negativo	Total
2019	64	188	252
2020	52	357	409
Total	116	545	661

Quanto à relação entre resultados positivos e negativos (Figura 5), é de realçar o maior número de resultados negativos nos dois anos. No ano de 2019 foram observados 25,4% de casos positivos e 74,6% de casos negativos. No ano de 2020 foram observados 12,7% de casos positivos e 87,3% de casos negativos. Concluindo assim que o SGA é o agente etiológico responsável por uma percentagem de casos positivos, bastante inferior do que a descrita por Dietrich *et al.* 2017 (47), nos dois anos em estudo. No entanto, em 2019 25,4% de resultados positivos para SGA em crianças com dores de garganta corresponde ao descrito na literatura (41). Em 2020 a percentagem de resultados positivos, é menor do que o esperado (41,47).

Em 2019 é observada uma maior percentagem de casos positivos detetados no teste cultural (25,4%) do que em 2020 (12,7%), o que corresponde a uma redução de cerca de metade dos casos de um ano para o outro. Uma possível explicação para este resultado, poderá ser o efeito da pandemia COVID-19. Desde março de 2020, que uma grande parte da população passou a viver em isolamento social e, fora de casa, foram implementados outros tipos de cuidados de higiene, como o uso de máscara e a constante desinfecção das mãos, objetos pessoais e superfícies (73). Quanto à população mais afetada pelo agente (crianças e adolescentes), com o fecho das creches, jardins de infância e escolas, e as novas medidas de higiene implementadas em todos esses estabelecimentos (73), poderão ter sido fatores determinantes para a redução da transmissão do agente entre estes, pois como referido anteriormente o principal veículo de transmissão é o contacto entre pessoas e através de gotículas do trato respiratório (47,49), constituindo assim fatores que decaíram desde o início da pandemia.



*Figura 5- Gráficos circulares com a percentagem de resultados positivos e negativos dos testes culturais realizados nos anos de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.*

Para averiguar a existência de diferenças significativas entre as percentagens de resultados positivos nos dois anos em estudo, verificou-se que o valor de  $P$  é de 0,307, concluindo-se assim que não existem diferenças significativas que permitam determinar alguma alteração na cadeia de transmissão do agente entre os anos em estudo.

Foi observado um total de 116 amostras com resultado positivo no teste cultural durante os dois anos em estudo para a pesquisa de SGA, sendo assim possível a partir deste valor, avaliar o sexo, faixa etária e mês da ocorrência com uma maior taxa de prevalência da infeção.

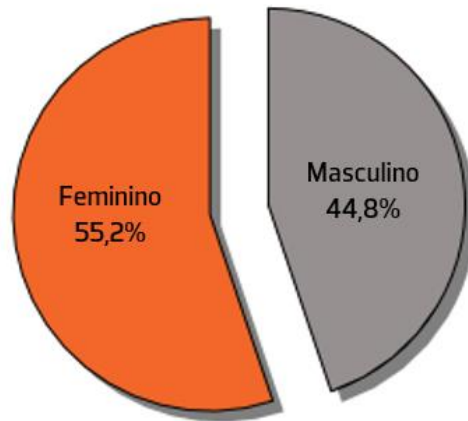
### **Distribuição dos casos segundo o Sexo**

Entre os 116 casos de amostras com resultado positivo, 52 correspondem a doentes do sexo masculino e 64 do sexo feminino, sendo que em cada ano, o predomínio de resultados positivos é observado no mesmo sexo (Tabela 2).

*Tabela 2- Número de casos positivos do sexo masculino e feminino detetados nos testes culturais, durante os anos de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.*

<b>Sexo</b>	<b>Nº de casos positivos em 2019</b>	<b>Nº de casos positivos em 2020</b>	<b>Nº de casos positivos totais</b>
<b>Masculino</b>	29	23	52
<b>Feminino</b>	35	29	64
<b>Total</b>	64	52	116

Optou-se por converter em percentagem, os resultados dos dois anos, (Figura 6), observando-se assim um predomínio de resultados positivos no sexo feminino com 55,2% e no sexo masculino com 44,8% dos casos, o que vem de encontro com os estudos realizados por Luo *et al.* 2019 e Wang *et al.* 2019 (46,51).



**Figura 6**– Gráfico circular com a percentagem de doentes do sexo masculino e feminino que obtiveram um resultado positivo no teste cultural para a pesquisa de SGA durante os dois anos em estudo.

Realizando uma análise inferencial, a partir do valor de  $P$  igual a 0,307, é possível afirmar que não é observada uma diferença significativa de casos positivos entre os dois sexos. Permitindo assim concluir que a incidência de casos positivos entre os dois sexos é semelhante, não considerando assim o sexo como um fator de risco para infecções causadas pelo agente em estudo (50).

### Distribuição dos casos segundo a Idade

Pela análise da Tabela 3, a distribuição dos 116 casos com casos positivos, consoante a faixa etária dos doentes. Verifica-se uma maior incidência de casos de infecção entre os 3 e os 11 anos e uma menor incidência acentuada dos 0 aos 2 anos e a partir dos 12 anos.

**Tabela 3**– Número de casos positivos em cada faixa etária detetados nos testes culturais para a pesquisa de SGA durante os anos de 2019 e 2020.

Faixa etária (Anos)	2019	2020	Nº de casos positivos
0 – 2	6	3	9
3 – 5	24	16	40
6 – 8	15	10	25
9 – 11	12	11	23
12 – 14	5	5	10
15 – 17	2	7	9
Total	64	52	116

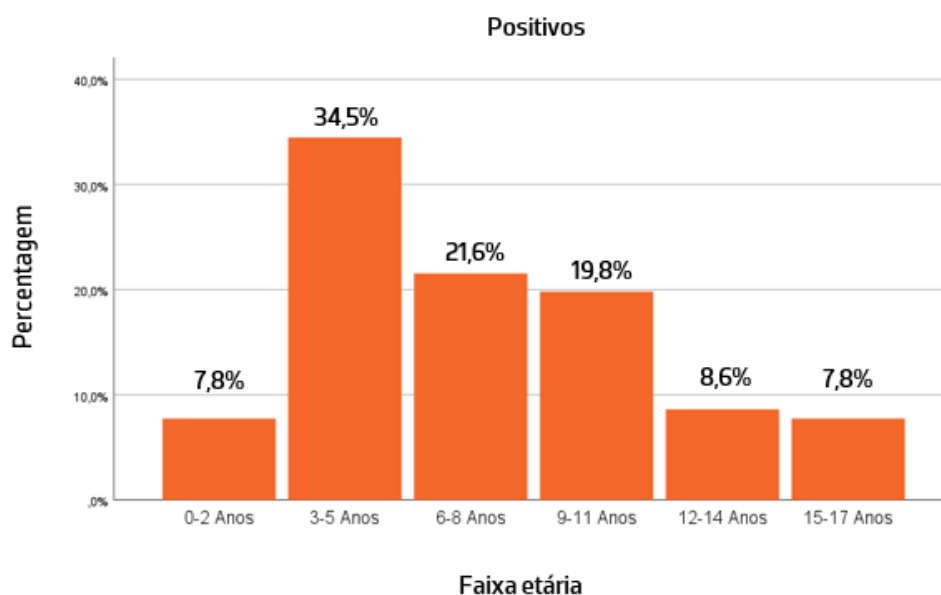
Na Figura 7, os resultados estão convertidos em percentagem, sendo assim possível comparar a distribuição da prevalência da infecção entre as faixas etárias em estudo.

Destaca-se o grande predomínio na faixa etária entre os 3 e os 5 anos que representa 34,5% dos casos. Esta idade corresponde ao jardim de infância, local onde existe um grande contacto entre crianças, assim como uma constante partilha de objetos e locais, permitindo uma rápida disseminação do agente entre estes, apoiando assim os resultados do estudo realizado entre 2005 e 2015 em Hong Kong (52).

As faixas etárias dos 6 aos 8 anos e dos 9 aos 11 anos possuem uma percentagem de incidência de 21,6% e 19,8%, respetivamente. Estas correspondem à idade escolar, sendo considerado o principal fator de risco para esta etiologia, devido a estes locais proporcionarem um grande contacto diário entre crianças (52), como observado no estudo de Danchin *et al.* 2007 (55).

Na faixa etária dos 0 aos 2 anos e dos 15 aos 17 anos é observada uma percentagem de 7,8% e entre os 12 e 14 anos, é observada uma percentagem de 8,6%. Este valor é consideravelmente menor que os observado nas restantes faixas etárias, comprovando assim que estas idades têm uma menor prevalência de infecção. A faixa etária menor que os 3 anos possui uma baixa incidência na maioria dos casos, levando a que estes sejam submetidos à realização do teste num menor número de vezes em comparação com outras idades (41).

Relativamente às restantes faixas etárias, esta apresenta uma reduzida incidência de infeções que pode ser explicada pelo elevado número de crianças que permanecem em ambiente familiar, apesar da existência de creches, e que por isso possuem um menor número de contactos entre si, o que diminui a transmissão do agente (47,52). Quanto às idades mais velhas, a partir dos 12 anos, é visível uma diminuição da prevalência de infeções, que poderá ser explicado devido à implementação de maiores cuidados de higiene que evolui ao longo da idade, no entanto este é um tema para o qual não existem muitos estudos (49).



*Figura 7- Gráfico de barras com a percentagem de cada faixa etária dos doentes que obtiveram resultado positivo no teste cultural realizado durante o ano de 2019 e 2020 para a pesquisa de SGA.*

O valor de  $P$  do teste de hipóteses que compara a diferença de resultados positivos nas diferentes faixas etárias, é menor que 0,001, o que comprova a existência de evidências estatísticas significativas, possibilitando assim afirmar que existem idades mais prevalentes a este tipo de infeções, conforme descrito na literatura (41,42,46,47,49,50).

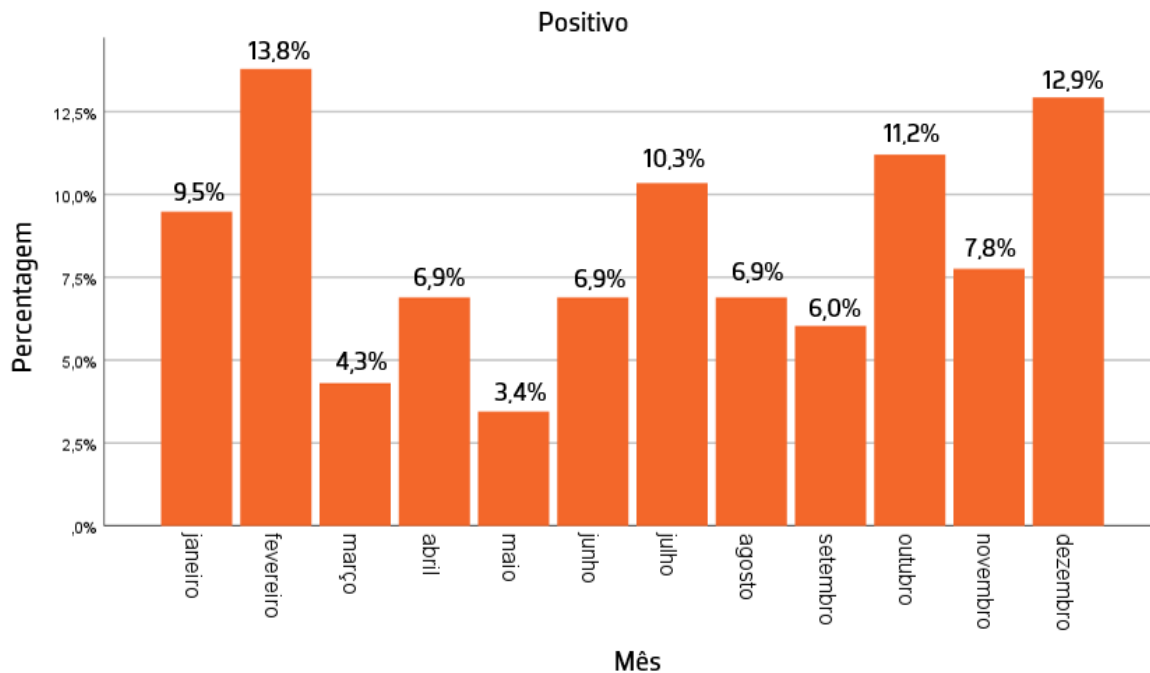
#### **Distribuição dos casos segundo o Mês da ocorrência**

A Tabela 4, expressa a distribuição de resultados positivos para a pesquisa de SGA consoante o mês da ocorrência da infeção, durante os dois anos em estudo. Através destes resultados, é possível observar que no ano de 2019 os meses com mais casos de infeção são dezembro ( $n=13$ ), outubro ( $n=10$ ) e abril ( $n=8$ ); no ano de 2020 o mês com maior número de casos detetados é fevereiro ( $n=14$ ), seguido do mês de janeiro ( $n=9$ ) e de julho ( $n=6$ ).

**Tabela 4**– Número de resultados positivos obtidos nos testes culturais durante os anos de 2019 e 2020, distribuídos consoante o mês da ocorrência da infeção.

Mês	Nº de casos positivos em 2019	Nº de casos positivos em 2020	Nº de casos positivos nos dois anos
Janeiro	2	9	11
Fevereiro	2	14	16
Março	2	3	5
Abril	8	0	8
Maio	2	2	4
Junho	5	3	8
Julho	6	6	12
Agosto	4	4	8
Setembro	5	2	7
Outubro	10	3	13
Novembro	5	4	9
Dezembro	13	2	15
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>52</b>	<b>116</b>

No seguinte Figura 8, é possível observar a percentagem de casos positivos no teste cultural consoante o mês da ocorrência, durante os dois anos em estudo. Como pode ser observado, o mês de fevereiro é o mês com maior percentagem de casos positivos, com 13,8%, de seguida o mês de dezembro com 12,9% de casos detetados e o mês de outubro com 11,2%, o que está de acordo com o descrito na literatura, que defende que os meses mais frios e os meses escolares são os responsáveis por uma maior taxa de prevalência da infeção(42,47,50,52,54–56). No entanto, é possível destacar o mês de julho, como sendo o 4º mês com maior percentagem de casos positivos (10,3%), contrariando assim a literatura, que defende que a menor taxa de infeção ocorre durante os meses de verão (51).



**Figura 8**– Gráfico de barras com a porcentagem de resultados positivos nos testes culturais para a pesquisa de SGA ao longo dos meses durante os anos de 2019 e 2020.

O valor de  $P$  do teste de hipóteses que compara a diferença de resultados positivos nos diferentes meses de ocorrência da infecção, é igual a 0,136, logo não existem estatísticas significativas, para afirmar que a ocorrência de infecções causadas pelo agente tem uma maior prevalência durante uma altura específica.

Como está descrito na literatura, os meses frios são os meses com maior prevalência de infecções causadas por este agente, representando o outono e inverno (42). Por esse motivo, foi realizado um teste do qui-quadrado às diferenças de resultados positivos de ocorrência da infecção, com o objetivo de avaliar a existência de diferenças significativas entre o semestre frio e quente dos dois anos em estudo (50). Os anos foram divididos de igual forma em dois semestres, o semestre frio, que inclui os meses de outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março; e o semestre quente que inclui abril, maio, junho, julho, agosto e setembro, numa aproximação possível às estações do ano, outono/inverno e primavera/verão. Foi obtido um  $P=0,051$ , observando assim um valor de  $P$  inferior ao anterior e muito próximo do nível de significância, o que mostra que as diferenças entre os positivos detetados nos dois semestres foram mais evidentes do que analisando mês a mês, no entanto, sendo ainda um valor ligeiramente superior a 0,05, não é possível identificar evidências estatísticas significativas para afirmar que as proporções de positivos nesses dois semestres são diferentes, contrariando assim o descrito por Marshall *et al.* 2015 (50).

### 3.4.2. Comparação dos resultados do teste rápido e do teste cultural

Para a seguinte análise, foram consideradas 513 amostras, às quais foram realizados os dois tipos de testes qualitativos descritos anteriormente, um teste rápido imunocromatográfico e um teste cultural, representando assim todos os pedidos de pesquisa de SGA realizados a partir do dia 27 de outubro de 2019 até ao dia 31 de dezembro de 2020 provenientes do Serviço de Urgência Pediátrica do HSS.

Uma resposta rápida quanto à presença de SGA auxilia o clínico no diagnóstico do agente etiológico da infecção, possibilitando-o assim de orientar a terapêutica consoante o resultado do mesmo (41,46). No caso de ser obtido um resultado positivo no teste rápido, o clínico deve dar início de forma rápida ao tratamento antimicrobiano, como forma de evitar possíveis complicações futuras e reduzindo assim a disseminação do agente (41). Um resultado negativo obtido neste teste, leva o clínico a acreditar que o agente tem origem viral, evitando assim o uso desnecessário de antibióticos (41). No entanto neste caso, deve ser realizada uma confirmação do resultado a partir dos testes culturais, devido a este ser considerado o “*Gold Standard*” para o diagnóstico deste tipo de infeções (41).

Como pode ser observado na Tabela 5, existe um grande número de amostras que obtiveram resultados concordantes pelos dois métodos testados, sendo que destes, 415 obtiveram resultado negativo e 62 resultado positivo. Em relação às amostras com resultados discordantes nos dois testes realizados, 10 possuem um resultado positivo no teste cultural e negativo no teste imunocromatográfico, por outro lado, 26 obtiveram resultado negativo no teste cultural e positivo no teste imunocromatográfico. Permitindo assim concluir, que foi observada uma grande maioria de testes com resultados concordantes ( $415+62=477$ ), em comparação com o número de resultados discordantes ( $10+26=36$ ), o que seria de esperar devido aos níveis de sensibilidade e especificidade descritos, levando este método a ser utilizado em diversos laboratórios (41).

Em comparação com os resultados obtidos nos testes culturais, é possível observar que a metodologia por testes imunocromatográficos possui um maior número de falsos positivos ( $n=26$ ) do que falsos negativos ( $n=10$ ), o que não seria de esperar devido ao teste rápido utilizado, possuir uma maior especificidade e menor sensibilidade (69), sendo obtidos falsos positivos em raros casos, como descrito por Shulman *et al.* 2012 (41).

O teste rápido para a deteção qualitativa de *Streptococcus pyogenes* BIOSYNEX®, utilizado no laboratório de Microbiologia possui uma sensibilidade relativa de 94,4% e uma especificidade relativa de 97,3% (69), o qual segue o princípio imunocromatográfico definido no ponto 2.3 deste trabalho.

Através dos dados presentes na Tabela 5, foi calculada a sensibilidade e especificidade do teste rápido utilizado, obtendo um valor de 86,1% e 94,1%, respectivamente, quando comparado com o resultado obtido no teste cultural da mesma amostra. Sendo assim possível concluir que os valores são ligeiramente inferiores aos descritos no boletim informativo do teste rápido (69).

**Tabela 5**– Resultados dos testes rápidos imunocromatográficos e dos testes culturais realizados nas 513 amostras colhidas para a pesquisa de SGA provenientes do Serviço de Urgência Pediátrica, desde outubro de 2019 até dezembro de 2020.

		Resultado teste cultural		
		Negativo	Positivo	Total
Resultado teste rápido	Negativo	415	10	425
	Positivo	26	62	88
	Total	441	72	513

No seguinte gráfico (Figura 9), é possível observar a percentagem de amostras com resultados concordantes obtidos em ambos os testes realizados (93%) e a percentagem de amostras com um resultado discordante (7%), concluindo assim que a concordância de resultados entre os dois testes realizados para cada amostra, é observada na maioria dos casos, como defendido pela literatura (48).



**Figura 9**– Gráfico circular com a percentagem de resultados concordantes e discordantes entre os dois tipos de testes realizados em cada amostra para a pesquisa de SGA.

A partir do teste do qui-quadrado para a igualdade entre duas proporções, a de resultados iguais e a de resultados diferentes, foi obtido um valor  $P < 0,001$ , pelo que se conclui que existem evidências estatísticas significativas, para afirmar que, tal como esperado, as proporções de resultados discordantes nos dois testes são diferentes dos resultados iguais nos dois testes. Este resultado apoia a realização dos testes rápidos para uma mais célere deteção do agente (41,46).

Alguns artigos defendem que para a pesquisa de SGA, deve ser realizado um teste rápido imunocromatográfico, e caso seja obtido um resultado negativo, este deve ser confirmado com um teste cultural (41,47), devido à grande incidência deste agente etiológico em casos de amigdalites, maioritariamente em crianças e adolescentes (41) e sendo que em alguns casos pode estar presente uma reduzida concentração do agente, dificultando assim a sua deteção (69).

No caso do teste rápido ter um resultado positivo, não é necessária confirmação devido à sua alta sensibilidade (43,74), sendo que consoante este resultado, o clínico deve iniciar de imediato o tratamento por antibioterapia (41,46).

A grande desvantagem em seguir esta metodologia, é o facto de não ser aconselhado o uso da mesma zaragatoa para inoculação da amostra num meio de cultura, após a utilização desta para a realização do teste imunocromatográfico (69), resultando na necessidade de realizar a colheita com duas zaragatoas diferentes para cada doente, dificultando assim todo o processo.

#### 4. Conclusão

Este relatório de estágio permitiu descrever alguns dos princípios, assim como atividades adquiridas durante estes 6 meses de estágio curricular, sendo que não foi possível descrever neste trabalho, todas as metodologias e procedimentos realizados, que correspondem ao normal funcionamento dos laboratórios de Microbiologia no Serviço de Patologia Clínica, no HSS. Para além da componente prática, obtive uma grande evolução quanto ao conhecimento geral de Microbiologia Clínica.

Quanto ao estudo desenvolvido acerca das amigdalites estreptocócicas, foi possível aumentar o conhecimento acerca do mesmo, em termos teóricos e práticos, assim como ganhar uma nova perspetiva quanto aos variados tipos de diagnóstico possíveis para a deteção dos agentes etiológicos a partir de uma simples amostra, mostrando assim a constante evolução da ciência como forma de melhoria da qualidade de vida de todos nós.

Aleado ao estudo realizado, com este trabalho, foi possível explorar um pouco mais as ferramentas de análise de dados e de inferência estatística aplicadas às Ciências da Saúde, permitindo validar ou refutar conjeturas e tirar conclusões sobre as populações em análise.

Com este projeto, verificou-se que as amigdalites estreptocócicas não estão associadas a um sexo, mas existem faixas etárias com maior prevalência de infeção. Ao contrário do referido na literatura, apurou-se ainda que não existiram evidências significativas relativamente à incidência do agente segundo a época sazonal. Uma das conclusões mais interessantes foi a proximidade de resultados obtidos entre os dois testes de diagnóstico, o teste cultural e o teste imunocromatográfico.

Seria interessante prolongar este estudo quanto aos resultados obtidos nas amostras processadas ao longo do decorrer da pandemia COVID-19, de modo a avaliar a longo prazo uma alteração do número de infeções causadas por SGA, devido aos cuidados implementados no combate à pandemia.

Por outro lado, com um estudo contínuo da comparação entre os dois tipos de testes realizados, deveria ser avaliada a possibilidade de melhoria no diagnóstico de SGA em casos de amigdalite nas crianças e adolescentes. Para isso, seria executado o procedimento descrito na literatura, realizando-se apenas o teste cultural no caso de ser obtido um resultado negativo no teste rápido, como forma de confirmação. Desta forma, minimizam-se variáveis importantes como o custo, o tempo e até os recursos materiais e humanos necessários.

## Referências Bibliográficas

1. Ankawi G, Neri M, Zhang J, Breglia A, Ricci Z, Ronco C. Extracorporeal techniques for the treatment of critically ill patients with sepsis beyond conventional blood purification therapy: the promises and the pitfalls. *Crit Care*. 2018 Dec 25;22(1):262.
2. Ombelet S, Ronat JB, Walsh T, Yansouni CP, Cox J, Vlieghe E, et al. Clinical bacteriology in low-resource settings: today's solutions. Vol. 18, *The Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2018. p. e248–58.
3. Tille PM. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 14th ed. Mosby; 2016.
4. Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. 2015;
5. Fonseca A, Sebastião C, Martins F, Ribeiro M, Calheiros I, Lito L, et al. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Programa Nacional de Controlo da infeção (PNCl) e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA); 2004.
6. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham III JO. *Collins and Lyne's Microbiological Methods*. 8th ed. London: Arnold; 2004.
7. Madison BM. Application of stains in clinical microbiology. *Biotech Histochem*. 2001;76(3):119–25.
8. Thairu Y, Usman Y, Nasir I. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African J Med*. 2014;1(4):168.
9. Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem*. 2001;76(3):111–8.
10. Coico R. Gram Staining. *Curr Protoc Immunol*. 1997 Sep;23(1).
11. Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. Differential staining of bacteria: Gram stain. Vol. Appendix 3, *Current Protocols in Microbiology*. Curr Protoc Microbiol; 2009.
12. Vilchèze C, Kremer L. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative Mycobacterium tuberculosis: The Koch Paradox. *Microbiol Spectr*. 2017;5(2).
13. Michno M, Sydor A. Urinary tract infections in adults. *Przegl Lek*. 2016;73(7):504–8.
14. Foxman B. Urinary tract infection syndromes. Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Vol. 28, *Infectious Disease Clinics of North America*. 2014. p. 1–13.
15. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. Vol. 22, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2016. p. 946–57.
16. Bio-Rad. *UriSelect™4*. France; 2013.
17. Cowan MK, Bunn J, Atlas RM. *Microbiology Fundamentals*. 2nd ed. McGraw-Hill Education; 2016.
18. Dekker J, Frank K. Salmonella, Shigella, and yersinia. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):225–46.
19. Fitzgerald C. Campylobacter. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):289–98.

20. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Vol. 18, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2012. p. 432–8.
21. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. 2012;
22. Becton&Dickinson. BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials. USA; 2016.
23. Becton&Dickinson. BACTEC Peds Plus/ F Culture Vials. USA; 2016.
24. Huber S, Hetzer B, Crazzolaro R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2020. p. 168–73.
25. Dien Bard J, Tekippe EM. *Diagnosis of Bloodstream Infections in Children*. 2016;
26. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care*. 2017;
27. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Publ Gr*. 2018;4.
28. Palavecino EL. Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2020. p. 29–45.
29. Sim BLH, McBryde E, Street AC, Marshall C. Multiple Site Surveillance Cultures as a Predictor of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections . *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013 Aug;34(8):818–24.
30. Süßmuth S, Brettschneider J, Spreer A, Wick M, Jesse S, Lewerenz J, et al. Current CSF diagnostics for pathogen-related diseases. *Nervenarzt*. 2013 Feb 2;84(2):229–44.
31. Putz K, Hayani K, Zar FA. Meningitis. Vol. 40, *Primary Care – Clinics in Office Practice*. W.B. Saunders; 2013. p. 707–26.
32. Rahimi J, Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 563–71.
33. Weller M. Immunochromatographic techniques– a critical review. *Fresenius J Anal Chem*. 2000;366(6–7):635–45.
34. Mascia Brunelli S.p.a. Strep grouping rapid latex test kit. Milan; 2018.
35. McGregor A, Schio F, Beaton S, Boulton V, Perman M, Gilbert G. The MicroScan WalkAway diagnostic microbiology system – an evaluation. *Pathology*. 1995;27(2):172–6.
36. Biomérieux. Gama de galerias API®. France; 2011.
37. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2018 Jun;26(6):555–6.

38. Bussi C, Gutierrez MG. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiol Rev.* 2019 Jul 1;43(4):341–61.
39. Sadeghirad B, Siemieniuk RAC, Brignardello-Petersen R, Papola D, Lytvyn L, Vandvik PO, et al. Corticosteroids for treatment of sore throat: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2017;358:3887.
40. Wessels MR. Streptococcal Pharyngitis. *N Engl J Med.* 2011 Feb 17;364(7):648–55.
41. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, et al. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis: 2012 Update by the Infectious Diseases Society of America. 2012;
42. Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. Vol. 13, *Clinical Microbiology and Reviews.* 2000.
43. Rocha A, Júnior B, Di C, Oliveira L, Jussara M, Fontes F, et al. Diagnóstico da faringoamigdalite estreptocócica em crianças e adolescentes: limitações do quadro clínico. *Rev Paul Pediatr.* 2014;32(4):285–91.
44. Baracco GJ. Infections Caused by Group C and G Streptococcus ( Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2).
45. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005 Nov;5(11):685–94.
46. Luo R, Sickler J, Vahidnia F, Lee Y-C, Frogner B, Thompson M. Diagnosis and Management of Group a Streptococcal Pharyngitis in the United States, 2011–2015. *BMC Infect Dis.* 2019 Dec 26;19(1):193.
47. Dietrich M, Steele R. Group A Streptococcus. *Pediatr Rev.* 2018;39(8):379–91.
48. Ebell MH. Does This Patient Have Strep Throat? *JAMA.* 2000 Dec 13;284(22):2912.
49. Avire NJ, Whiley H, Ross K. A Review of Streptococcus pyogenes: Public Health Risk Factors, Prevention and Control. *Pathogens.* 2021 Feb 22;10(2):248.
50. Marshall H, Richmond P, Nissen M, Lambert S, R, Booy R, Reynolds G, et al. Group A Streptococcal Carriage and Seroepidemiology in Children up to 10 Years of Age in Australia. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(8):831–8.
51. Wang A, Fine A, Buchanan E, Janko M, Nigrovic L, Lantos P. A Bayesian Spatiotemporal Analysis of Pediatric Group A Streptococcal Infections. *Open forum Infect Dis.* 2019;6(12).
52. Lee C, Cowling B, Lau E. Epidemiology of Reemerging Scarlet Fever, Hong Kong, 2005–2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(10):1707–10.
53. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology.* 8th ed. Elsevier; 2016.
54. Gerber MA. Comparison of throat cultures and rapid strep tests for diagnosis of streptococcal pharyngitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1989 Nov;8(11):820–4.

55. Danchin MH, Rogers S, Kelpie L, Selvaraj G, Curtis N, Carlin JB, et al. Burden of acute sore throat and group A streptococcal pharyngitis in school-aged children and their families in Australia. *Pediatrics*. 2007;120(5):950–7.
56. Oppegaard O, Mylvaganam H, Kittang B. Beta-haemolytic group A, C and G streptococcal infections in Western Norway: a 15-year retrospective survey. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(2):171–8.
57. Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes Basic Biol to Clin Manifestations*. 2016;1–15.
58. Leung TN, Hon K, Leung AK. Group A Streptococcus disease in Hong Kong children: an overview. *Hong Kong Med J*. 2018;
59. Barnett TC, Bowen AC, Carapetis JR. The fall and rise of Group A Streptococcus diseases. *Epidemiol Infect*. 2018;
60. Jespersen MG, Lacey JA, Tong SYC, Davies MR. *Global genomic epidemiology of Streptococcus pyogenes*. Elsevier. 2020.
61. Kuttner AG, Krumwiede E. *Observations on the epidemiology of streptococcal pharyngitis and the relation of streptococcal carriers to the occurrence of outbreaks*. Irvingt House, Irvington-on-Hudson, NY. 1944;
62. Kemble SK, Westbrook A, Lynfield R, Bogard A, Kockavay N, Gall K, et al. Foodborne Outbreak of Group A Streptococcus Pharyngitis Associated With a High School Dance Team Banquet—Minnesota, 2012. *Clin Infect Dis*. 2013 Sep 1;57(5):648–54.
63. Kobayashi M, Lyman M, Francois Watkins L, Toews K, Bullard L, Radcliffe R, et al. A Cluster of Group A Streptococcal Infections in a Skilled Nursing Facility—the Potential Role of Healthcare Worker Presenteeism. *J Am Geriatr Soc*. 2016;64(12):e279–84.
64. Ijaz M, Ameen F, Alfoteih YA, Shamim S, Alshehri WA, Murtaza G. Dissecting Streptococcus pyogenes interaction with human. *Arch Microbiol*. 2020 Oct 5;202(8):2023–32.
65. Shaikh N, Leonard E, Martin JM. Prevalence of Streptococcal Pharyngitis and Streptococcal Carriage in Children: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 2010 Sep 1;126(3):e557–64.
66. Tyrrell GJ, Fathima S, Kakulphimp J, Bell C. Increasing Rates of Invasive Group A Streptococcal Disease in Alberta, Canada; 2003–2017. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Aug 1;5(8).
67. Vieira FMJ, Figueiredo CR, Soares MC, Weckx LY, Santos O, Magalhães G, et al. Prevalence of Streptococcus pyogenes as an oropharynx colonizer in children attending daycare: a comparative study of different regions in Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Sep;72(5):587–91.
68. Chiappini E, Regoli M, Bonsignori F, Sollai S, Parretti A, Galli L, et al. Analysis of Different Recommendations From International Guidelines for the Management of Acute Pharyngitis in Adults and Children. *Clin Ther*. 2011 Jan;33(1):48–58.

69. Biosynex. Biosynex Strep A. Swiss; 2020.
70. Becton&Dickinson. BD Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood. Germany; 2013.
71. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol.* 2016 Feb 10;78(1):481–504.
72. Kelly MT, Smith JA, Jaffer S, Pearce L, Clarke A. Outpatient Evaluation of a Rapid, Direct Test for Detection of Group A Streptococci in Throat Swabs. *Am J Clin Pathol.* 1987 Apr 1;87(4):522–5.
73. Wilder-Smith A, Freedman DO. Isolation, quarantine, social distancing and community containment: pivotal role for old-style public health measures in the novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak. *J Travel Med.* 2020 Mar 13;27(2).
74. Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, Esposito S, Huovinen P, Little P, et al. Guideline for the management of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Apr;18(1):1–27.

## Anexos

**Anexo 1– Metodologia utilizada no processamento de cada tipo de amostra recebida nos laboratórios de Microbiologia, como os meios de cultura, tipo de sementeira realizada e o material utilizado no processo. Metodologia utilizada nos meios sólidos e líquidos em todo o tipo de amostras.**

Produtos	Meios de cultura	Sementeiras	Material utilizado
Urina- micção ou algália	Uriselect™4	Estria	Ansa 1µL
Exsudado vaginal	Chocolate, VCAT, CNA, Granada, Sabouraud	4 quadrantes	Zaragatoa e ansa 10 µL
Exsudado vaginal/retal para pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i>	Todd Hewitt e Granada	4 quadrantes	Zaragatoa e ansa 1 µL
Exsudado retal para a pesquisa de carbapenemases	CHROMID® CARBA SMART Agar	4 quadrantes	Zaragatoa e ansa 10 µL
Fezes	SS, Hektoen, CIN, Campylobacter, SMAC e Selenito	4 quadrantes	Ansa 10 µL
Exame micológico	Sabouraud	4 quadrantes	Depende do tipo de produto
Respiratórios (esputo, AB, LB, LBA)	Sangue, Chocolate, CNA, MacConkey	4 quadrantes	Ansa 10 µL
Exsudados nasais para a pesquisa MRSA	MRSA II	4 quadrantes	Zaragatoa e ansa 10 µL
Zaragatoa orofaríngea	CNA	4 quadrantes	Zaragatoa e ansa 10 µL
LCR	Sangue, Chocolate	3 gotas	Pipeta de Pasteur
Líquidos não purulentos	Chocolate, CNA, MacConkey, Frasco de cultura Bactec	4 quadrantes	Ansa 10 µL
Líquidos purulentos	Chocolate, CNA, MacConkey, Brucella e Caldo de carne	4 quadrantes	Ansa 10 µL
Cateter	Sangue	Maky	
Tecidos e exsudados de ferida	Sangue, Chocolate, MacConkey, CNA, Brucella, Caldo de carne	4 quadrantes	Ansa 10 µL

Meios líquidos	Tempo de incubação (dias)	Local de incubação	Repicagens para os meios de cultura	Sementeira	Ansa
Todd Hewitt	1	Estufa a 37°C ± 2°C	Granada	4 quadrantes	1 µL
Selenito	1	Estufa a 37°C ± 2°C	SS e Hektoen	4 quadrantes	10 µL
Caldo de Carne	4	Estufa a 37°C ± 2°C	Sangue, Chocolate, Brucella e Sabouraud	4 quadrantes	10 µL
Hemocultura Aeróbia	5	Bactec™ 9000	Sangue e Chocolate	4 quadrantes	10 µL
Hemocultura Anaeróbia	5	Bactec™ 9000	Sangue, Chocolate e Brucella	4 quadrantes	10 µL
Hemocultura pediátrica	5	Bactec™ 9000	Sangue e Chocolate	4 quadrantes	10 µL
Hemocultura fungos	14	Bactec™ 9000	Sangue, Chocolate e Sabouraud	4 quadrantes	10 µL

**Anexo 2- Descrição do tipo, utilidade, constituição e incubação de cada meio de cultura utilizado no laboratório de Microbiologia. Adaptado de Biomerieux, Becton, Dickinson & Company e Bio-Rad.**

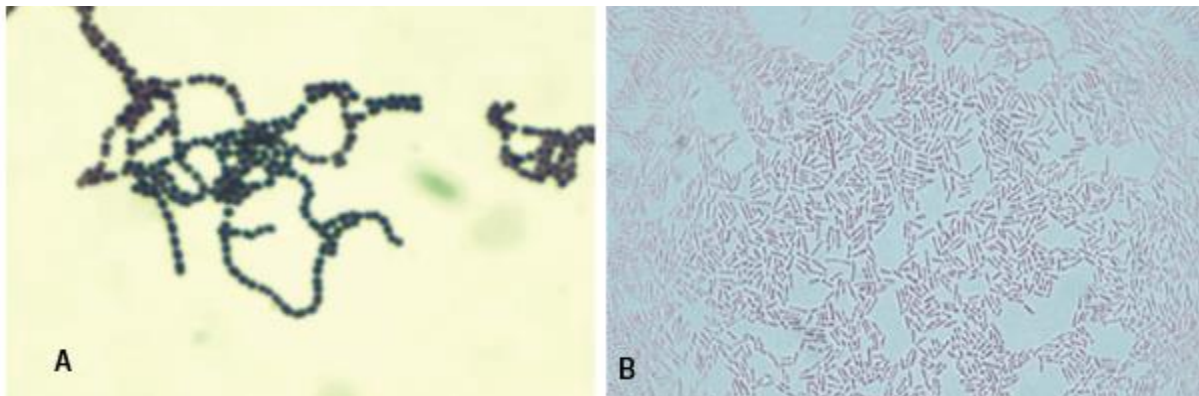
Nome	Tipo	Utilidade	Constituição	Incubação
<b>Brain-heart (caldo de carne)</b>	Líquido, não seletivo.	É um meio de enriquecimento para a cultura de microrganismos de várias espécies bacterianas e de fungos.	Infusões de tecido cerebral e cardíaco, peptonas que estimulam o crescimento dos agentes presentes na amostra, cloreto de sódio, dextrose e fosfato sódico.	35 ± 2 °C, durante cerca de 4 dias.
<b>Gelose Sangue</b>	Sólido, não seletivo e diferencial.	Permite o crescimento da maioria dos microrganismos exigentes e não exigentes e possibilita a observação de hemólise formada pelas colónias.	Agar com sangue de ovelha a 5% que permite a deteção de hemólise e fornece o fator X que contribui para o crescimento de espécies patogénicas, peptonas e extrato de leveduras como fonte de vitaminas, cloreto de sódio e amido de milho.	35°C ± 2 °C durante cerca de 24h em atmosfera aeróbia.
<b>Gelose Chocolate</b>	Sólido, não seletivo e diferencial	Permite o crescimento da grande maioria dos microrganismos. É principalmente utilizado para o crescimento de organismos fastidiosos, como a <i>Neisseria spp</i> e <i>Haemophilus spp</i> .	Fatores X e V que permite o crescimento destes agentes, peptonas, amido de milho, fosfato dipotássio de hidrogénio e cloreto de sódio. Possui também na sua constituição eritrócitos que sofreram hemólise.	35°C ± 2 °C durante cerca de 24h em atmosfera aeróbia.
<b>CNA (meio sangue com colistina e ácido nalidíxico)</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento de bactérias Gram positivas.	Extratos de leveduras e carne de bovino, que permitem o desenvolvimento dos agentes, colistina e ácido nalidíxico que inibem o crescimento de Gram negativos e estimulam o crescimento de Gram positivos.	35°C ± 2 °C durante cerca de 24h em atmosfera aeróbia.
<b>MSA (manitol salt agar) ou Chapman</b>	Sólido, seletivo e diferencial.	Permite o isolamento seletivo de <i>Staphylococcus spp.</i> e a identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Peptonas e extrato de bovino, permitem o desenvolvimento, NaCl inibe o crescimento dos organismos que não sejam <i>Staphylococcus spp</i> , manitol e vermelho de fenol que permitem a diferenciação entre espécies.	35 ± 2 °C durante cerca de 24h numa atmosfera aeróbia.
<b>Uriselct™4</b>	Sólido, não seletivo e diferencial cromogénico	É utilizado maioritariamente para a cultura de amostras de urina, permitindo assim o isolamento, diferenciação e quantificação de colónias.	Peptonas, triptofano, misturas cromogénicas que possibilitam a diferenciação de cor entre espécies, facilitando assim a sua identificação, sílica e agar.	35 ± 2 °C durante cerca de 24h em ambiente aeróbio.
<b>MacConkey</b>	Sólido, diferencial e seletivo	Permite o isolamento de bactérias Gram negativas.	Sais biliares e cristal violeta que inibem o crescimento de bactérias Gram positivas e permite diferenciar os organismos fermentadores de lactose e não fermentadores, cloreto de sódio, vermelho neutro, agar e as peptonas fornecem os nutrientes para o desenvolvimento dos agentes.	35 ± 2 °C durante cerca de 24h numa atmosfera aeróbia.

<b>Hektoen</b>	Sólido, moderadamente seletivo e diferencial	Utilizado principalmente para o isolamento de <i>Shigella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i> provenientes de amostras fecais.	Os sais biliares inibem o crescimento de Gram positivos e retraem o crescimento de alguns Gram negativos. Fucsina ácida e azul de bromotimol permitem distinguir os agentes fermentadores dos seus compostos como a lactose, sacarose e salicina. A presença de citrato de amónio férrico e tiosulfato de sódio permitem a deteção de sulfureto de hidrogénio (H <sub>2</sub> S) produzido pela <i>Salmonella spp.</i> , formando colónias de centro preto.	35 ± 2 °C durante cerca de 24h numa atmosfera aeróbia.
<b>Salmonella-Shigella (SS)</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Utilizado principalmente para o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> em amostras de fezes humanas.	Tal como no meio Hektoen, a presença de sais biliares inibe o crescimento dos Gram positivos e de alguns Gram negativos. É possível distinguir a presença de organismos fermentadores de lactose, devido à presença do indicador vermelho neutro, a presença de tiosulfato de sódio e de citrato férrico permitem a deteção de H <sub>2</sub> S.	35 ± 2 °C durante cerca de 24h numa atmosfera aeróbia.
<b>Selenito</b>	Líquido, não seletivo	Este meio tem a capacidade de diminuir o crescimento excessivo de outras espécies microbianas presente em fezes, facilitando assim o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> a partir de repicagens feitas do meio líquido.	Peptona de caseína como forma de enriquecimento, lactose e selenito de sódio, que tem a capacidade de diminuir o crescimento de bactérias Gram positivas e a maior parte das bactérias entéricas Gram-negativas, com a exceção de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>	35 ± 2 °C durante cerca de 12h a 24h.
<b>Granada</b>	Sólido, seletivo e diferencial cromogénico	Permite o isolamento e diferenciação de <i>Streptococcus agalactiae</i> , em amostras de exsudados vaginais/retais provenientes de grávidas.	Peptonas como fonte de proteína, amido, glucose, piruvato e cisteína como nutrientes, cristal violeta, inibidores de crescimento de organismos que fazem parte da flora e anaeróbios estritos e indutores que estimulam a formação de pigmentos de cor alaranjada nas colónias do agente em estudo.	35 ± 2 °C durante cerca de 24h numa atmosfera anaeróbia.
<b>Sabouraud</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Este meio é utilizado para o isolamento e cultura de fungos.	Para além do agar e dos constituintes nutritivos, a elevada concentração de glucose e o baixo nível de pH cria o meio ideal para o crescimento de fungos e dificulta o crescimento da maioria das bactérias.	Entre 25°C e 35°C desde 48h a 3 semanas, consoante o organismo em estudo.
<b>Brucella</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento e crescimento de espécies bacterianas anaeróbicas.	Permite o crescimento de agentes exigentes devido à sua concentração de peptonas que fornece nitrogénio, extrato de leveduras como fonte de vitaminas, sangue de cavalo, glucose, cloreto de sódio e bissulfato de sódio.	35 ± 2 °C durante cerca de 48h em atmosfera anaeróbia com presença de CO <sub>2</sub>

<b>Muller Hinton Simples (MH)</b>	Sólido, não seletivo e diferencial	Permite testar a sensibilidade dos microrganismos de crescimento rápido aos antimicrobianos, através do método de difusão em discos ou tiras de papel impregnadas com substâncias antimicrobianas.	O meio é constituído por extrato de bovino, ácido de caseína, amido e agar.	35°C ± 2°C durante cerca de 24h em atmosfera aeróbia.
<b>Muller Hinton Sangue (MHS)</b>	Sólido, não seletivo e diferencial	Permite testar a sensibilidade antimicrobiana em microrganismos exigentes, seguindo o mesmo princípio do meio MH.	Para além dos constituintes presentes no meio de MH, este possui sangue de equídeo e β-NAD, facilitando assim o crescimento dos organismos fastidiosos.	35°C ± 2°C durante cerca de 24h em ambiente aeróbio com presença de CO <sub>2</sub>
<b>Lowenstein-Jensen</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento e cultivo de micobactérias.	Glicerol e mistura de ovo que fornecem as proteínas necessárias para o desenvolvimento das micobactérias, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio, citrato de sódio, farinha de batata, L-Asparagina e verde malaquite.	35 ± 2°C, durante cerca de 8 semanas.
<b>Staphylococcus aureus metilina resistente (MRSA II)</b>	Sólido, seletivo e diferencial.	Utilizado para o isolamento e identificação de MRSA provenientes de amostras de exsudados nasais.	Possui peptonas, agar, sílica, uma mistura de antibióticos, antifúngicos e uma concentração de sal, que inibe o crescimento de microrganismos Gram negativos, leveduras e alguns Gram positivos. Com a presença de cromogéneos específicos, é possível destacar as colónias de MRSA das restantes.	35°C ± 2°C durante cerca de 24h em ambiente aeróbio, fora do alcance da luz.
<b>Todd Hewitt</b>	É um meio líquido seletivo	Permite o enriquecimento seletivo de <i>Streptococcus agalactiae</i> em amostras provenientes de exsudados retais/vaginais.	Colistina e ácido nalidíxico que inibem o crescimento de Gram negativos, extratos de levedura peptonas, dextrose e sais, a fim de promover o crescimento dos estreptococos.	37°C ± 2°C, durante cerca de 24h.
<b>Novobiocina-Irgasan-Cefsulodina (CIN)</b>	Sólido, meio seletivo e diferencial	Permite o isolamento e diferenciação de <i>Yersinia spp.</i>	Peptonas, manitol, que é um indicativo de presença do agente em caso de fermentação e a inibição dos restantes agentes é dada com a presença de cristal violeta, desoxicolato de sódio e os antimicrobianos cefsulodina, irgasan e novobiocina.	Temperatura ambiente em aerobiose, durante cerca de 24h.
<b>Campylobacter Agar</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento de <i>Campylobacter spp.</i> proveniente de amostras de fezes humanas.	Sangue de cavalo lisado, infusão de coração, peptona de caseína e o extrato de leveduras que fornecem nutrientes, cloreto de sódio que permite manter a estabilidade osmótica, vancomicina, trimetoprim e polimixina B que inibem o crescimento de uma grande parte dos organismos da flora.	42°C ± 2°C durante cerca de 48h em microaerofilia (com baixos níveis de O <sub>2</sub> e altos níveis de CO <sub>2</sub> )

<b>CHROMID® CARBA SMART Agar</b>	Sólido, seletivo e diferencial cromogéneo	Permite isolar Enterobactérias produtoras de carbapenemases em amostras provenientes de exsudados retais.	Peptonas, antibióticos que permitem um crescimento seletivo e substratos cromogéneos facilitando assim a identificação dos agentes.	35°C ± 2°C numa atmosfera aeróbia durante cerca de 24h.
<b>MacConkey Agar with Sorbitol (SMAC)</b>	Sólido, parcialmente seletivo e diferencial	Permite o isolamento de <i>E. coli</i> O157:H7 proveniente de amostras de fezes.	Peptonas como fonte de hidrogénio, sais biliares e cristal violeta que inibem o desenvolvimento dos Gram positivos e o vermelho neutro é utilizado como indicador de pH. O D-sorbitol permite a deteção de <i>E. coli</i> enteropatogénica, devido a não ser fermentado por este agente.	35°C ± 2°C numa atmosfera aeróbia durante cerca de 24h.
<b>VCAT</b>	Sólido, seletivo e diferencial	Permite o isolamento <i>Neisseria spp.</i>	Para além da constituição de Gelose Chocolate, possui também vancomicina, que inibe o crescimento de Gram positivos, colistina inibe o crescimento de Gram negativos, anfotericina B inibe o crescimento de fungos e leveduras.	35 ± 2°C durante 48 a 72 horas com presença de CO <sub>2</sub> .

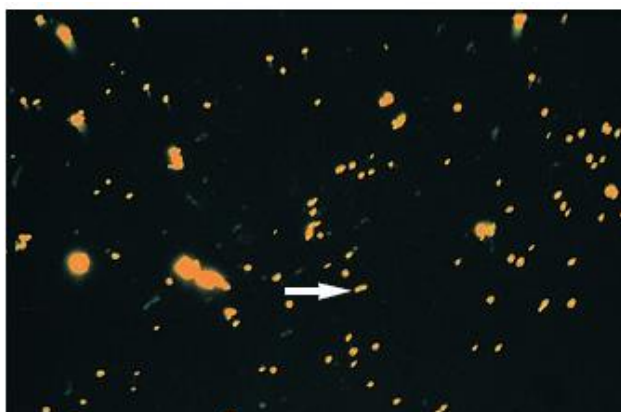
**Anexo 3– Distinção entre organismos segundo a coloração de Gram. Na imagem A está presente um organismo com morfologia de cocos positivos, apresentando uma cor arroxeadada. Adaptado de Medical Microbiology (2013); Na imagem B está presente um organismo com morfologia de bacilos negativos, com uma cor avermelhada. Adaptado de Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology (2016).**



**Anexo 4**– Procedimento utilizado pelo equipamento Poly Stainer para coloração de Gram.

1	Fixar os esfregaços na lâmina, com chama;
2	Cobrir as lâminas com cristal violeta durante 1 minuto;
3	Cobrir as lâminas com lugol durante 1 minuto;
4	Lavar as lâminas em água destilada;
5	Cobrir as lâminas com álcool-acetona durante 30 segundos;
6	Lavar as lâminas em água destilada corrente;
7	Cobrir as lâminas com safranina durante 1 minuto;
8	Lavar as lâminas em água destilada corrente;
9	Deixar secar à temperatura ambiente.

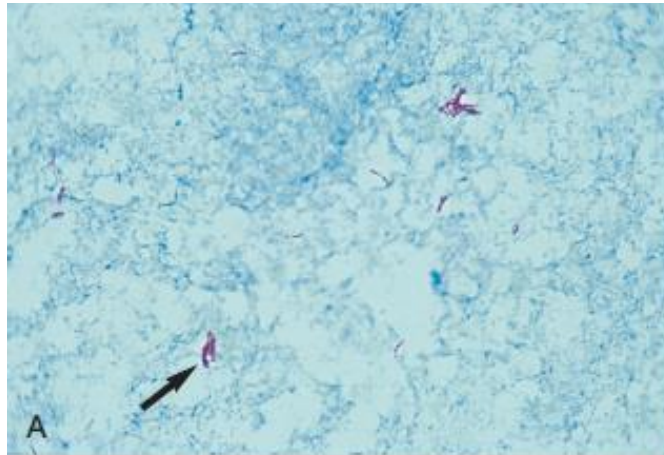
**Anexo 5**– Bacilos álcool ácido resistentes corados por Auramina. Adaptado de Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology (2016).



**Anexo 6**– Procedimento utilizado pelo equipamento Poly Stainer para coloração por Auramina.

1	Fixar os esfregaços em metanol e deixar as lâminas secar ao ambiente;
2	Cobrir a lâmina com auramina durante 15 minutos;
3	Cobrir a lâmina com álcool-ácido durante 5 minutos;
4	Lavar com água corrente;
5	Cobrir a lâmina com permanganato de potássio durante 30 segundos;
6	Lavar as lâminas com água corrente;

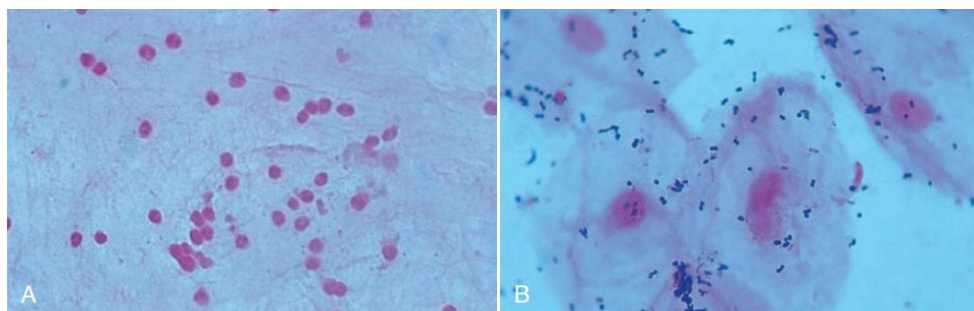
**Anexo 7-** Bacilos álcool-ácido resistentes através da coloração de Ziehl-Neelsen. Adaptado de Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology (2016).



**Anexo 8-** Procedimento de coloração manual de Ziehl-Neelsen.

1	Fixar o esfregaço com metanol e deixar secar ao ambiente;
2	Cobrir as lâminas com fucsina durante 10 minutos;
3	Lavar as lâminas em água destilada corrente;
4	Cobrir as lâminas com álcool-ácido durante 3 minutos;
5	Lavar as lâminas em água destilada corrente;
6	Cobrir as lâminas com azul de metileno durante 1 minuto;
7	Lavar as lâminas em água corrente e deixar secar;

**Anexo 9-** Pode ser observado na imagem duas amostras de expetoração numa ampliação de 100x. Na imagem A pode ser observada uma boa amostra, com a presença de mais de 25 leucócitos polimorfonucleares e sem células epiteliais. Na imagem B está representada uma má amostra, pois são observadas inúmeras células epiteliais, uma flora polimicrobiana e raros leucócitos polimorfonucleares. Adaptado de Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology (2016).



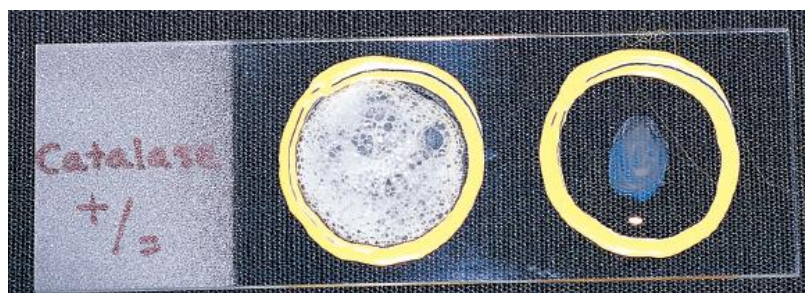
**Anexo 10-** Leitura do resultado dos testes imunocromatográficos. No resultado positivo aparecem duas bandas, uma no local do controlo (C) e outra no local do teste (T). No resultado negativo, aparece apenas uma banda no local do controlo. Nos resultados inválidos não aparece banda no local do controlo. Adaptado do boletim informativo do teste qualitativo para a deteção de *Clostridium difficile*.



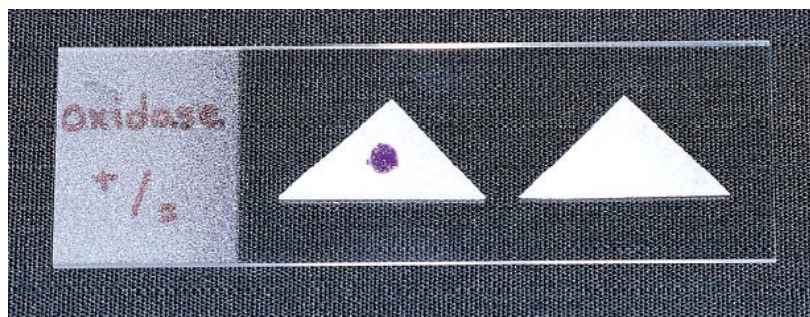
**Anexo 11-** Testes rápidos imunocromatográficos realizados no laboratório de Microbiologia nas variadas amostras.

Tipo de amostra	Testes imunocromatográficos realizados para a pesquisa de
Fezes	<i>Clostridium difficile</i> Ag GDH Toxinas A e B de <i>Clostridium difficile</i> <i>Rotavírus</i> e <i>Adenovírus</i> <i>Astrovírus</i> <i>Norovírus</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Sangue oculto <i>Escherichia coli</i> O157:H7
Urina	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1
Colónias	Deteção de carbapenemases OXA-48, KPC e NMD <i>Escherichia coli</i> O157:H7
Exsudado da orofaringe	<i>Streptococcus pyogenes</i>

**Anexo 12-** Comparação entre uma reação Catalase Positiva (Esquerda) e Catalase Negativa (Direita). Adaptado de Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology (2016).



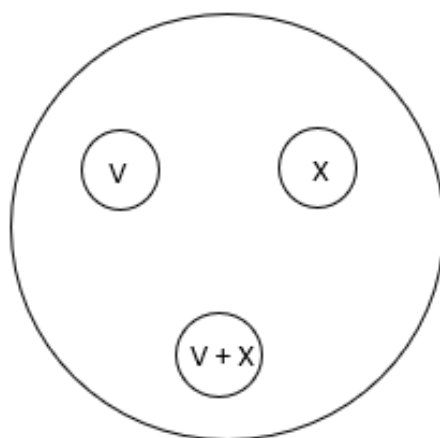
**Anexo 13-** Comparação entre uma reação Oxidase Positiva (Esquerda) e Oxidase Negativa (Direita). Adaptado de Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology (2016).



**Anexo 14-** Comparação entre uma reação Coagulase Positiva (Esquerda) e Coagulase Negativa (Direita).



**Anexo 15-** Metodologia utilizada para o estudo do crescimento de *Haemophilus* spp, em torno dos discos impregnados com fatores de crescimento V, X e V+X.



**Anexo 16**– Procedimento para a realização do teste de aglutinação para *Streptococcus* do Grupo de Lancefield A, B, C, D, F e G. Adaptado do Boletim informativo do teste, Mascia Brunelli @ S.p.a 2018.

Etapa	Procedimento
1	Depositar 0,4mL da enzima extratora no tubo do teste;
2	Com o auxílio de uma zaragatoa tocar em cerca de 5 colónias isoladas e homogeneizar a solução;
3	Colocar o tubo com a suspensão numa estufa a 35°C ± 2°C durante cerca de 15 minutos;
4	Homogeneizar novamente a suspensão;
5	Colocar uma gota do reagente específico para cada grupo num círculo do cartão de aglutinação;
6	Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, adicionar 1 gota da suspensão em cada círculo do cartão, juntamente com os respetivos reagentes;
7	Agitar o cartão durante cerca de 1 minuto, até ser possível observar o resultado.

**Anexo 17**– Tipos de painéis de antibiogramas realizados no laboratório de Microbiologia. Adaptado de Beckam Coulter.

Painel	Objetivo	Organismos
PC42	Identificação e Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	Gram positivos
NC82	Identificação e Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	Gram negativos, com teste de oxidase negativo
NUC81	Identificação e Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	Gram negativos, com teste de oxidase negativo em amostras de urina pois possui os antimicrobianos utilizados para o tratamento específico de infeções urinárias.
NC83	Identificação e Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	Gram negativos, com teste de oxidase positivo
RyID	Identificação	Leveduras
MR	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	Organismos previamente identificados como multirresistentes.
ESBL	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	Organismos produtores de $\beta$ -lactamases de espectro alargado. Este painel não é introduzido no equipamento, a sua incubação ocorre numa estufa a 35°C ± 2°C durante cerca de 24h e é lido manualmente através da deteção de turvação dos poços.

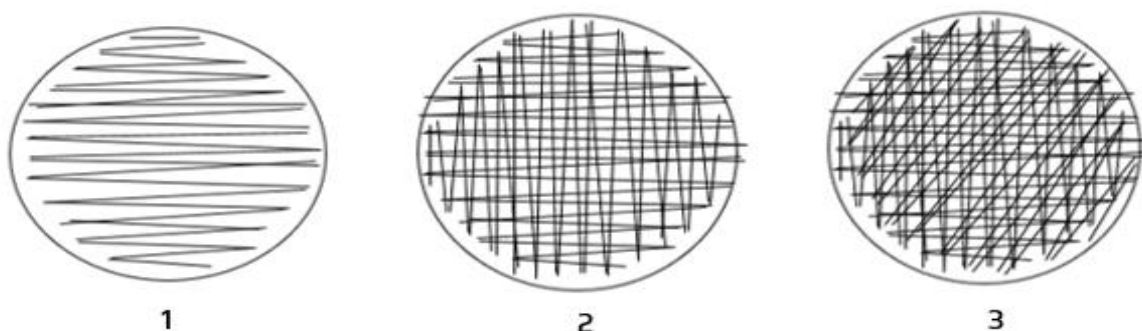
**Anexo 18**– Procedimento utilizado na realização de identificação e antibiogramas. Adaptado do Manual de Procedimentos para Painéis do instrumento MicroScan Walkaway Plus System, Beckam Coulter.

Etapa	Procedimento
1	Utilizar uma vara de inoculação fornecida pelo kit e tocar em 3 colónias isolada no meio de cultura;
2	Retirar o anel do eixo da vara e descartar, permitindo regular a quantidade de amostra inoculada;
3	Introduzir a vara num frasco de inoculação Prompt e selar bem;
4	Agitar vigorosamente o frasco de modo a soltar as bactérias, permitindo a sua difusão no meio;
5	Abrir o frasco e com a vara realizar um inóculo da suspensão numa placa com meio UriSelect™4 para Gram negativos e em meio gelose sangue para Gram positivos, utilizados como controlo;
6	Descartar a vara;
7	Deitar a suspensão obtida no tabuleiro de sementeira;
8	Colocar a tampa de transferência no tabuleiro de sementeira;
9	Pipetar com o auxílio do pipetador manual RENOK a suspensão para o painel MicroScan, inoculando e hidratando assim todos os poços do painel;
10	Inserir o painel no instrumento MicroScan Walk away Plus System.

**Anexo 19**– Procedimento para a realização do teste de suscetibilidade aos antibióticos através método de difusão em disco ou tiras. Adaptado de Matuschek et al. 2013.

Etapa	Procedimento
1	Preparar uma suspensão com densidade de 0,5 McFarland, utilizando colónias isoladas em garrafas de inóculo com NaCl 0,85%;
2	Com o auxílio de uma zaragatoa, fazer um espalhamento em rede em 3 direções por todo o meio; nesta fase, pode ser utilizada uma placa com meio Muller Hinton Simples ou Muller Hinton Sangue para organismos de crescimento fastidioso;
3	Com o auxílio de uma pinça esterilizada, são colocados os discos ou as tiras no meio, sobre o espalhamento;
4	As placas devem ser incubadas numa estufa a 35°C ± 2°C durante cerca de 18h em ambiente aeróbio, no caso dos meios Muller Hinton Sangue, devem estar também sobre um ambiente com presença de CO2 a 5%.

**Anexo 20**– Exemplificação do espalhamento realizado para o método de difusão em disco ou tiras.



**Anexo 21**– Tipo de amostras e quantidades utilizadas para a pesquisa de micobactérias.

Amostra	Quantidade (ml)
Aspirado brônquico	5 ml
Lavado bronco-alveolar	20 a 50 ml
LCR	2 ml
Suco gástrico	5 a 10 ml
Fezes	1 g
Urina	Toda a primeira urina da manhã
Líquidos	15 ml

**Anexo 22-** Procedimento para o tratamento de amostras para a pesquisa de micobactérias. Todo este processo deve ser desenvolvido numa câmara de segurança biológica com os devidos equipamentos e segurança.

1	Nas situações em que a amostra é muito abundante, deve ser centrifugada em tubos de Falcon de 50ml, durante 20 minutos a 3800rpm, aproveitando apenas o sedimento para o restante processo;
2	Adicionar 0,5ml de BBL Mgit PANTA em cada tubo Mgit;
3	Colocar toda a amostra ou o sedimento para o tubo de Falcon de 50ml;
4	Adicionar uma quantidade de NALC-NaOH ativada, igual à quantidade da amostra;
5	Agitar a solução no vortex até a amostra ficar liquefeita
6	Deixar a solução repousar por 15 minutos à temperatura ambiente;
7	Adicionar tampão fosfato BBL MycoPrep (pH 6,8) até atingir os 50 ml e homogeneizar;
8	Centrifugar os tubos por 20 minutos a 3800rpm;
9	Descartar o sobrenadante;
10	Adicionar ao sedimento 1ml de tampão fosfato BBL MycoPrep e homogeneizar com a pipeta;
11	Verificar o pH do preparado, que deve estar entre 6,8 e 7. Se necessário, adicionar HCl a 2% para acidificar, ou NaOH a 2% para basificar.
12	Inocular 0,5ml da solução preparada para o tubo Mgit;
13	Inocular 4 gotas da solução preparada para cada tubo de Lowenstein-Jensen, são utilizados dois tubos por amostra;
14	Realizar um esfregaço em 2 lâminas para serem coradas posteriormente;
15	Guardar o restante da amostra no tubo de arquivo, caso seja necessário.