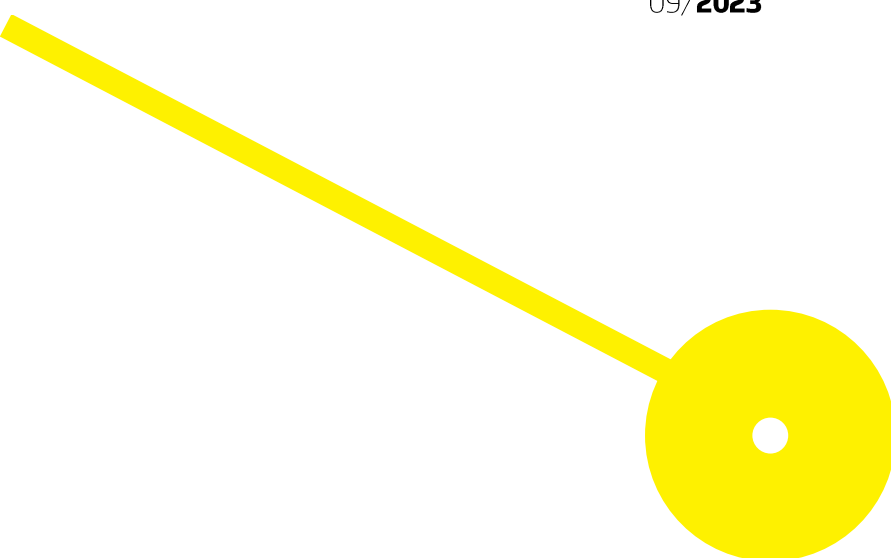




# Nocardiose cutânea em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana: Scoping Review

Rita Sá Azevedo Moura de Oliveira

09/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Nocardiose cutânea em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana:  
Scoping Review**

**Autor**

Rita Sá Azevedo Moura de Oliveira

**Orientador(es)**

Professora Coordenadora e Especialista em ACSP, Maria Manuela Amorim, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde Do Porto do ESS|PPorto  
Coordenadora do Setor de Microbiologia Laboratório Central do Porto da Unilabs, Dra Cristina Silva

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

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à professora Maria Manuela Amorim pelo apoio incansável e disponibilidade para a concretização do meu Relatório de Estágio.

À Dra. Cristina Silva da Unilabs por me ter acolhido e integrado na equipa do Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto. Agradeço também a disponibilidade e ajuda durante o meu período de estágio.

À restante equipa do Setor de Microbiologia, em particular à Anita, à Clara, à Maria e ao Sr. Francisco. Sem as suas partilhas de conhecimento e amabilidade não teria adquirido a maior parte dos conhecimentos no âmbito da microbiologia clínica.

À minha família e amigos, o meu agradecimento especial por me terem acompanhado durante todo o meu percurso académico e me terem incentivado sempre a seguir os meus sonhos.

Aos meus padrinhos, mãe e Duarte, um "obrigada" não é suficiente para agradecer todo o apoio que me deram. Bem-haja!

## Resumo

O presente Relatório encontra-se dividido em dois capítulos. O primeiro aborda os conhecimentos e competências adquiridas e desenvolvidas no âmbito do estágio curricular, no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, e o caso clínico-laboratorial aí encontrado. O segundo integra a Scoping Review realizada sobre a Nocardiose cutânea em indivíduos portadores do Síndrome da Imunodeficiência Humana (HIV).

O estágio curricular teve como principal objetivo aprofundar a formação na área da Microbiologia Clínica, bem como fornecer ferramentas para o desempenho de um papel importante na promoção da saúde pública, prevenção da doença, no diagnóstico, terapêutica e controlo de doenças infecciosas.

A Scoping Review sistematiza conhecimentos sobre a prevalência de Nocardiose cutânea em doentes com HIV, como consequência da imunossupressão a que estão sujeitos, suas manifestações clínicas, diversidade de metodologias clínico-laboratoriais utilizadas para o diagnóstico e terapêutica.

A Nocardiose revelou ser mais comum em homens, estabelecendo-se uma relação com o uso de drogas intravenosas. Os sintomas da doença incluem lesões na pele e sintomas sistémicos. O diagnóstico é desafiador devido à diversidade de métodos utilizados. A falta de uma abordagem integrada e de equipas multidisciplinares constitui um problema. O tratamento envolve antibióticos, sendo a terapia prolongada recomendada em casos graves. É necessária para padronizar diretrizes de diagnóstico e tratamento. A sistematização do conhecimento produzido pelas investigações é fulcral para o aprofundar do conhecimento, assim como orientar a investigação de forma a melhorar o diagnóstico e a terapêutica, aumentando assim a qualidade de vida dos doentes com HIV que contraíram a infeção por *Nocardia*.

**Palavras-chave:** infeção *Nocardia*, pele, HIV, síndrome imunodeficiência humana.

## Abstract

The present report is divided in two chapters. The first one discusses the knowledge and skills acquired and developed during the internship in the Microbiology Department of the Unilabs Central Laboratory in Porto, as well as the clinical-laboratory case encountered there. The second includes the Scoping Review conducted on Cutaneous Nocardiosis in individuals with Human Immunodeficiency Virus (HIV).

The primary objective of the internship was to deepen training in Clinical Microbiology and provide tools for playing a crucial role in public health promotion, disease prevention, diagnosis, therapy, and infectious disease control.

The Scoping Review synthesizes knowledge about the prevalence of Cutaneous Nocardiosis in HIV patients due to their immunosuppressed condition, its clinical manifestations, the diversity of clinical-laboratory methods used for diagnosis and therapy.

Nocardiosis was found to be more common in men, with a connection to intravenous drug use. Symptoms of the disease include skin lesions and systemic symptoms. Diagnosis is challenging due to the variety of methods used. The lack of an integrated approach and multidisciplinary teams is a problem. Treatment involves antibiotics, with prolonged therapy recommended for severe cases. Standardizing diagnostic and treatment guidelines are necessary. Systematizing the knowledge produced by research is essential for deepening understanding and guiding further research to improve diagnosis and therapy, thereby enhancing the quality of life for HIV patients who contract Nocardia infection.

**Keywords:** *Nocardia* infection; skin; HIV; immunologic deficiency syndromes.

## Organização do Relatório

Este Relatório descreve a componente do estágio realizada no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, incluindo o estudo de um caso clínico-laboratorial, e a componente de Scoping Review sobre Nocardiose cutânea. Estas duas componentes estão organizadas em dois capítulos:

- Capítulo I – contextualiza o estágio, objetivos, metodologias apreendidas e praticadas no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, e apresenta o caso clínico-laboratorial realizado de identificação da *Nocardia*;
- Capítulo II – integra a Scoping Review sobre Nocardiose cutânea em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human immunodeficiency virus*).

## Índice

Capítulo I – Relatório de Estágio .....	1
1. Introdução.....	1
1.1. Instituição e contextualização do estágio.....	1
1.2. Objetivos do Estágio.....	1
2. Diagnóstico Laboratorial em Microbiologia Clínica .....	2
2.1. Etapas Laboratoriais .....	2
2.1.1. Fase Pré-analítica.....	3
2.1.2. Fase Analítica .....	3
2.1.3. Fase Pós-analítica.....	3
2.2. Gestão da qualidade .....	4
2.2.1. Avaliação Externa Qualidade .....	4
2.2.2. Controlo de Qualidade Interno .....	5
2.3. Exame Microbiológico.....	6
2.3.1. Exame Direto .....	6
2.3.1.1. Colorações .....	6
2.3.1.2. Gram .....	7
2.3.1.3. Ziehl-Neelsen .....	7
2.3.1.4. Auraminas.....	8
2.3.2. Exame Cultural.....	8
2.3.2.1. Meios de cultura.....	8
2.3.2.2. Sementeiras .....	9
2.3.2.3. Amostras biológicas.....	10
2.3.2.3.1. Urina.....	10
2.3.2.3.2. Fezes .....	11
2.3.2.3.3. Exsudados do trato génito-urinário .....	12
2.3.2.3.4. Exsudados do Trato respiratório superior .....	12
2.3.2.3.5. Exsudados do Trato respiratório inferior.....	13
2.3.2.3.6. Hemoculturas.....	13
2.3.2.3.7. Cateteres.....	14

2.3.2.3.8.	Tecidos e exsudados de feridas superficiais e profundas.....	14
2.3.2.3.9.	Líquidos de Cavidades Naturais .....	14
2.3.2.3.10.	Unha, pele e cabelo .....	15
2.4.	Identificação de Microrganismos.....	15
2.4.1.1.	MALDI Biotyper™ .....	16
2.4.2.	Testes de Identificação Presuntivos .....	17
2.4.2.1.	Teste da Oxidase.....	17
2.4.2.2.	Teste da Catalase.....	17
2.4.2.3.	Kit BD BBL DrySlide™ Nitrocefin.....	18
2.5.	Antibiogramas.....	18
2.5.1.	MicroScan WalkAway 96 plus .....	18
2.5.2.	Vitek.....	19
2.5.3.	Testes de difusão em disco .....	19
2.5.4.	Gradiente de Concentração.....	20
2.6.	Pesquisa de Anaeróbios .....	20
2.7.	Pesquisa de Micoplasma e Ureaplasma .....	20
2.8.	Testes imunocromatográficos.....	21
2.9.	Parasitologia.....	22
Capítulo II - Nocardiose cutânea em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana .....		
		27
1.	Introdução.....	27
2.	Objetivo.....	28
3.	Material e Métodos .....	29
4.	Resultados.....	30
5.	Discussão.....	41
6.	Conclusão.....	45
Referências Bibliográficas.....		46
Anexos.....		57

## Índice de Figuras

Figura 1 – Técnicas de sementeiras utilizadas no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto Unilabs. Sementeira por: Quadrantes (A), Estria (B), Gota (C) e Rolamento em placa (D)....	10
Figura 2 – Diferentes morfologias e formas de agregação dos microrganismos (2).....	16
Figura 3 – Parasitas visualizados ao microscópio ótico (ampliação de 40x) durante o Estágio no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto Unilabs. A – <i>Endolimax nana</i> ; B – <i>Entamoeba coli</i> ; C – <i>Giardia lamblia</i> ; D – <i>Enterobius vermicularis</i> .....	24
Figura 4 – Exsudado da bolha da mão.....	25
Figura 5 – Inoculação do exsudado em Gelose de Sangue e em Sabouraud.....	25
Figura 6 – Sementeira primária em Gelose de Sangue após 24 horas de incubação. Observam-se numerosas colónias rugosas brancas característica de <i>Nocardia</i> .....	25
Figura 7 – Presença de 3 colónias rugosas brancas em Gelose de Sangue, obtidas do isolamento feito a partir da 1ª placa de Gelose de Sangue (Fig. 6).....	25
Figura 8 – Coloração de Ziehl-Neelsen das colónias de <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> .....	26
Figura 9 – Coloração de Gram das colónias de <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> .....	26
Figura 10 – Esquema relativo à extração de resultados.....	30

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resumo dos artigos incluídos na Scoping Review .....	31
Tabela 2 – Descrição meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs.....	57

## Capítulo I – Relatório de Estágio

### 1. Introdução

#### 1.1. Instituição e contextualização do estágio

O presente relatório foi elaborado no âmbito da unidade curricular de Estágio do curso de Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, do ramo de especialização em Microbiologia e Saúde Pública. O estágio teve a duração de quatro meses consecutivos, compreendidos entre novembro de 2022 e fevereiro de 2023, no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs.

A Unilabs é uma empresa multinacional, líder no diagnóstico laboratorial e a sua história tem mais de 50 anos. É constituída por laboratórios certificados e acreditados, operacionais 24 horas por dia, 365 dias por ano, com a tecnologia mais inovadora e profissionais altamente qualificados. Foi adquirida pela Maersk, uma empresa dinamarquesa, aquando a aquisição de 100% dos laboratórios Carlos Torres. Em Portugal dispõem de mais de 900 Unidades de Colheita de amostras biológicas.

#### 1.2. Objetivos do Estágio

Este estágio teve como objetivos adquirir conhecimentos gerais e aprofundados na área de Microbiologia Clínica; desenvolver a capacidade de execução das metodologias implementadas na rotina do laboratório; adquirir conhecimentos relativos às metodologias utilizadas para a identificação de microrganismos e realização de testes de suscetibilidade; interpretar e compreender os resultados obtidos e a sua validação bem como integrar a rotina de funcionamento de um laboratório de Microbiologia Clínica.

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

As infeções bacterianas bem como as multiresistências possuem um elevado impacto na Saúde Pública de todo o mundo tratando-se de um problema emergente (1). Considerando o facto de serem das principais causas de mortalidade e morbidade, é essencial conter o foco de infeção, interromper a cadeia de transmissão, e proteger o hospedeiro do agente infeccioso(1). Deste modo, o diagnóstico célere e rigoroso assume um papel fundamental na resposta em tempo útil. O laboratório de Microbiologia é responsável pela análise bacteriológica, virológica, parasitológica e micológica de diversos produtos biológicos como urina, fezes, expectoração, exsudados (genitais e purulentos), esperma, entre outros.

Dada a dimensão do Laboratório Central do Porto da Unilabs e o elevado volume de amostras recebidas diariamente, os equipamentos automatizados existentes no Setor de Microbiologia, como Maldi-TOF, VITEK, WalkAway e Sysmex UF-5000 constituem uma mais valia contribuindo para a maior eficácia e eficiência da resposta dada por este. Tratando-se de um laboratório de elevado risco biológico é obrigatório existirem sistemas de ventilação que previnem a contaminação do espaço e dos técnicos do mesmo. Deste modo, a Câmara de Fluxo Laminar é o local apropriado para a manipulação das amostras biológicas de elevado risco biológico (2).

Ao longo deste Relatório de Estágio serão descritos os circuitos implementados no laboratório de Microbiologia desde a entrada da amostra até emissão do resultado. De forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos é fundamental a existência no laboratório de um sistema de Gestão da Qualidade.

### **2.1. Etapas Laboratoriais**

As etapas laboratoriais são constituídas por 3 fases que a seguir se descrevem: Pré-analítica, Analítica e Pós-analítica. A fase Pré-analítica tem início na requisição médica e envolve todos os procedimentos até à fase Analítica. Nesta fase, os profissionais executam as técnicas analíticas a fim de obter um resultado que será validado e dado como terminado na fase Pós-analítica. De realçar que é na fase analítica que se procedem às etapas mais críticas da análise laboratorial. Por este motivo, merecem uma atenção especial e redobrada por parte dos sistemas de Gestão da Qualidade, de forma a que sejam estabelecidos procedimentos padronizados para cada uma destas fases.

### **2.1.1. Fase Pré-analítica**

A fase pré-analítica diz respeito aos procedimentos realizados desde a requisição dos exames até ao envio das amostras para o respetivo laboratório onde será realizada a fase analítica(3). No Setor da Triagem do Laboratório Central do Porto da Unilabs, as amostras provenientes dos vários postos de colheita, amplamente distribuídos por todo o país, são rececionados de acordo com os requisitos expressos nas instruções de trabalho para esta fase. São verificadas as informações clínicas e identificação do doente bem como o tipo de análise que consta na requisição médica, os respetivos recipientes de colheita e os requisitos para o transporte que garanta a qualidade da amostra. Seguidamente são encaminhados para os vários setores do laboratório (3).

### **2.1.2. Fase Analítica**

Aquando a chegada dos produtos encaminhados pela Triagem ao Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, procede-se à divisão dos mesmos por categorias: urinas tipo 2 que seguirão para a bancada onde está instalado o equipamento Sysmex UC e os produtos com pedidos de Exame Microbiológico. Após esta divisão, realiza-se o Exame Laboratorial que inclui a análise macroscópica, em que é feito o registo do aspeto e aparência das amostras, se relevante (volume; cor; turvação; entre outros relevantes), e seguidamente o Exame Microscópico através do Exame Direto e do Exame Cultural. Após serem efetuados todos os procedimentos para a deteção e identificação do microrganismo presente nas amostras biológicas bem como a realização dos testes de suscetibilidade a antibióticos, os resultados do estudo microbiológico das amostras prosseguem para a área da validação.

### **2.1.3. Fase Pós-analítica**

No Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, os médicos e farmacêuticos são responsáveis pelo processo de validação os resultados obtidos, tendo por base o controlo de todo o processo analítico e a história clínica expressa sobre o doente. O processamento dos resultados deve ser efetuado no tempo estipulado previamente e comunicados ao doente em tempo útil.

Tratando-se também esta fase uma etapa decisiva no processo de análise clínica, é extremamente importante assegurar a precisão e exatidão dos resultados.

## **2.2. Gestão da qualidade**

Atualmente, os laboratórios de Microbiologia têm uma maior importância dada a emergência constante de novos microrganismos, bem como o aumento das resistências aos antimicrobianos. Deste modo, é extremamente relevante que os laboratórios assegurem as medidas de controlo da qualidade para que os resultados obtidos sejam rigorosos (3). Com o intuito de avaliar sistemas específicos dos serviços de saúde, a Organização Internacional para a Normalização (ISO) desenvolveu sistemas de gestão da qualidade baseados em normas e englobando toda a estrutura organizacional, responsabilidades, procedimentos, processos e recursos (3). De destacar a norma ISO 9001 pela qual todos os laboratórios nacionais e internacionais têm de se reger na implementação e certificação de um sistema de gestão da qualidade para os laboratórios clínicos (4). Há áreas no laboratório que a norma ISO 9001 não está expandida e pela sua importância estão desenvolvidas outras normas como a ISO 17025 (Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração) e a ISO 15189 (Requisitos para a qualidade e competência de laboratórios clínicos) (4).

No grupo Unilabs, a garantia do Sistema de Controlo de Qualidade (SCQ) cumpre os requisitos expectáveis. Este é um conjunto de atividades/procedimentos implementados de forma a controlar os processos do laboratório desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica, garantindo desta forma que os resultados obtidos são fidedignos (3). No Laboratório Central do Porto da Unilabs, particularmente no Setor de Microbiologia, são implementados dois tipos de Controlo de Qualidade: a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), e o Controlo de Qualidade Interno (CQI).

Em suma, a Gestão da Qualidade Laboratorial deve contemplar o controlo de qualidade interno e externo, de forma a monitorizar e garantir a qualidade dos procedimentos e resultados obtidos (3).

### **2.2.1. Avaliação Externa Qualidade**

Os resultados da Avaliação Externa de Qualidade (AEQ) são uma ferramenta concebida com o objetivo de corroborar a utilidade dos controlos internos de um laboratório. Esta forma de avaliação é disponibilizada por vários fornecedores e permite avaliar o desempenho analítico das diferentes metodologias do laboratório, tendo por comparação resultados padronizados. As amostras fornecidas pelas entidades externas de referência e avaliação externa de qualidade, de

natureza desconhecida, são enviadas para o Laboratório, neste caso para o Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, para procederem à sua análise. Os resultados obtidos da análise dessas amostras são enviados de volta para a entidade de avaliação externa de modo que este possa, por comparação com os resultados esperados avaliar a qualidade de desempenho do Setor, assim obtidos por outros laboratórios (4). Nesta área da Microbiologia existem vários programas de avaliação de controlo da qualidade externa, que têm como objetivo garantir a exatidão e precisão dos resultados laboratoriais através da comparação desses com resultados obtidos por diferentes laboratórios. Destacam-se: 1) National External Quality Assessment Scheme (NEQAS); 2) Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial (PNAEQ) coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; 3) External Quality Assessment Scheme (EQAS); 4) Randox Internacional Quality Assessment Scheme (RIQAS).

Ao longo do meu estágio tive a oportunidade de visualizar a aplicação do programa NEQAS e PNAEQ-INSa, no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, bem como compreender a importância destes para o bom funcionamento do laboratório dado que permitem que se detetem variações ou imprecisões nos seus métodos, podendo desta forma corrigi-los e por sua vez melhorar a qualidade dos resultados.

### **2.2.2. Controlo de Qualidade Interno**

O Controlo de Qualidade Interno (CQI) consiste na implementação de um conjunto de medidas preventivas e corretivas que visam reduzir os erros e garantir a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos. É semelhante ao controlo de qualidade externo, contudo o material a ser analisado é preparado, distribuído e os resultados avaliados dentro da própria instituição (5). No Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, é realizado mensalmente o controlo de qualidade interno de todas as superfícies do Setor bem como o controlo de ar do mesmo. O controlo de superfícies é feito utilizando um aplicador Count-Tact® e as respetivas Placas Count-Tact®. Após o período de incubação de 48 horas a 37°C, as placas são inspecionadas e procede-se à identificação das colónias. Os resultados são analisados e quando é verificado um desvio em relação ao esperado, procede-se à correção das anomalias. Já o controlo de ar é feito utilizando placas de Gelose de Sangue que são colocadas nos locais que se pretende avaliar a qualidade do ar, durante cerca de 2 a 5 minutos e depois segue-se o mesmo procedimento das placas de controlo de superfícies (2). Para além destes controlos, também tive a oportunidade de observar, a aplicação do American Type Culture Collection (ATCC) que é uma

organização que recolhe, armazena e distribui um conjunto de padrões biológicos para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em laboratório bem como analisar a consistência dos métodos laboratoriais. De salientar que o Laboratório Central do Porto da Unilabs utiliza os materiais biológicos fornecidos pela entidade ATCC nas suas análises o que assegura a qualidade dos resultados obtidos (6).

### **2.3. Exame Microbiológico**

Após a receção das amostras no Setor de Microbiologia, estas são semeadas em diferentes meios de cultura de acordo com o microrganismo que se pretende detetar. Para além disso, há também exames solicitados e determinados microrganismos que requerem apenas a realização de Testes Imunocromatográficos, ou ainda como para a análise parasitológica através de técnicas de microscopia ótica.

#### **2.3.1. Exame Direto**

O Exame Direto em Microbiologia deve ser preconizado em todo o tipo de amostras biológicas uma vez que permite avaliar inicialmente a qualidade das mesmas bem como a visualização e identificação de microrganismos diretamente a partir da amostra (7). Dependendo do tipo de amostra são efetuadas diferentes tipos de colorações que permitirão uma melhor visualização do conteúdo biológico. Este tipo de exame é importantíssimo, uma vez que possibilita o diagnóstico de infeções bacterianas, fúngicas e parasitárias a partir da célere identificação do agente etiológico causador da infeção (8).

##### **2.3.1.1. Colorações**

As colorações em Microbiologia são técnicas usadas para corar as células dos microrganismos de modo a que a sua visualização ao microscópio seja facilitada permitindo um diagnóstico preliminar do agente etiológico causador da infeção. Baseiam-se na capacidade destas células de absorver e reter corantes específicos nas diferentes estruturas das mesmas. Constituem um método rápido, económico e de execução pouco complexa. A visualização do exame microscópio realizado aos esfregaços corados, constitui um elevado grau de complexidade pelo que deve ser realizado por técnicos especializados (9). Na rotina laboratorial em Microbiologia, a maioria das amostras possui requisição para pesquisa de bactérias pelo que existem várias colorações específicas para este tipo de microrganismos.

### **2.3.1.2. Gram**

A designação da coloração de Gram deve-se ao facto de ter sido Hans Christian Gram, que desenvolveu esta técnica pela primeira vez em 1882, com o objetivo de identificar microrganismos causadores de pneumonia (10). Esta é uma das técnicas de coloração mais usadas em Microbiologia que consiste na primeira abordagem para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (11).

Primeiramente utiliza-se o corante cristal violeta para coloração da lâmina. Depois é utilizado uma solução de iodo para fixar o corante, levando à formação do complexo cristal violeta-iodo. Após este passo, o descolorante (acetona ou solvente de etanol) remove todo o corante da lâmina. Por fim, o corante Fucsina é utilizado para corar as bactérias Gram-negativas que perderam a coloração (10).

O princípio desta coloração baseia-se no facto das bactérias Gram-positivas terem ácido teicóico na sua constituição e um elevado teor de peptidoglicano nas suas paredes celulares. Por esse motivo impedem a saída do corante primário aquando a descoloração da lâmina. Assim, estas retêm o corante primário adquirindo a cor azul-violeta. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas sofrem descoloração permanecendo com uma cor avermelhada.

### **2.3.1.3. Ziehl-Neelsen**

A coloração de Ziehl-Neelsen foi criada por Franz Ziehl e posteriormente melhorada por Friedrich Neelsen, no final do século XIX (12). É utilizada para corar bactérias que não conseguem ser coradas pelo método de Gram como é o caso das bactérias do género *Mycobacterium* e *Nocardia*. Porém, existem bactérias que são resistentes a esta coloração sendo denominadas bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) devido ao alto teor de lípidos estruturais na parede celular que causa uma elevada hidrofobicidade dificultando a ação dos corantes.

No processo de coloração com Fucsina de Ziehl, todos os elementos celulares adquirem a cor vermelha. Após a descoloração, com álcool, apenas os BAAR permanecem com a cor vermelha pois todos os outros serão descolorados e posteriormente corados pelo azul de metileno. A elevada relevância desta técnica, prende-se com o facto de a pesquisa de BAAR em amostras com suspeita de Tuberculose, ser a primeira evidência de doença permitindo desta forma o início do tratamento enquanto se aguarda o resultado do Exame Cultural (13).

#### **2.3.1.4. Auraminas**

Coloração usada para detetar diretamente micobactérias da Tuberculose, presentes em amostras biológicas. O corante auramina estabelece ligação com os ácidos micólicos presentes na parede celular das bactérias, tornando-se fluorescente sob luz ultravioleta (UV). Deste modo, as micobactérias serão visíveis ao microscópico UV com a coloração amarela brilhante esverdeado fluorescente contra um fundo escuro. Contudo, apesar desta coloração ser mais rápida e sensível do que a coloração de Ziehl-Neelsen, não é específica para micobactérias pelo que é necessário efetuar a confirmação sempre que há um caso suspeito (11).

#### **2.3.2. Exame Cultural**

Apesar da relevância do Exame Direto no diagnóstico de doenças infecciosas, o Exame Cultural constitui uma etapa fundamental para comprovar a identificação do agente etiológico. Este exame baseia-se na cultura de amostras biológicas em meios de cultura de acordo com as suas características bem como com o tipo de microrganismos em estudo. Para que ocorra crescimento nesses meios é necessário que estes possuam características específicas para cada tipo de microrganismo. É extremamente importante obter culturas puras de microrganismos para que a sua identificação seja facilitada tendo em conta as suas características não só morfológicas como fisiológicas (7).

##### **2.3.2.1. Meios de cultura**

Um meio de cultura fornece aos microrganismos nutrientes, vitaminas, fontes de energia e fatores de crescimento necessários para o seu desenvolvimento. Tendo em conta as características dos meios de cultura, estes podem ser classificados em: não-seletivos, seletivos, diferenciais, de enriquecimento, sólidos e líquidos. Os meios não-seletivos permitem o crescimento da maioria dos microrganismos. Por outro lado, os meios de cultura seletivos possuem na sua fórmula fatores que irão inibir o desenvolvimento de determinados microrganismos e contribuir para o crescimento de outros. Já os meios de cultura diferenciais contêm na sua composição fatores que possibilitam que determinados microrganismos desenvolvam colónias características que são diferenciadoras das formadas por outros. Para além disso, os meios de enriquecimento são muito úteis pois são líquidos que fornecem os nutrientes necessários para os microrganismos crescerem. Este tipo de cultura é muito vantajoso uma vez que permite o rápido crescimento de vários microrganismos e é também utilizado para criopreservar espécies de bactérias, fungos e parasitas (2).

Na Tabela 2, dos Anexos, encontram-se descritas as características e princípios de todos os meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs.

### **2.3.2.2. Sementeiras**

De acordo com o tipo de microrganismo que se pretende inocular, recorre-se a diferentes técnicas de sementeira. Estas dividem-se em sementeiras em meio sólido em placa (esgotamento por quadrantes, estria, gota e rolamento em placa), sementeiras em meio sólido em tubo (em superfície e em profundidade) e sementeiras em meio líquido (inoculação com ansa e com pipeta) (8).

A sementeira por esgotamento por quadrantes é o tipo de sementeira mais utilizado em Microbiologia uma vez que permite estimar o número de colónias presentes na amostra inicial, já que permite a visualização das colónias de forma isolada no quarto quadrante facilitando assim o estudo do microrganismo presente na amostra biológica. Nesta técnica deposita-se uma gota de inóculo numa das margens da placa e procede-se ao espalhamento da mesma segundo quatro quadrantes, como mostra a Figura 1A (14).

Na sementeira por estria deposita-se uma gota do inóculo numa das margens da amostra e faz-se uma estria longitudinal ao longo da zona central da placa. De seguida fazem-se variadas estrias perpendicularmente cobrindo toda a placa (Figura 1B). Esta técnica de sementeira permite a contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro (mL) (14).

Na sementeira por gota, comumente utilizada em amostras de Líquido Cefalo-Raquidiano (LCR), são depositadas três gotas da amostra no meio de cultura, utilizando uma pipeta de Pasteur. Este método utiliza a amostra concentrada o que facilita a deteção de qualquer tipo de crescimento bacteriano (Figura 1C) (14).

A sementeira por rolamento em placa é frequentemente utilizada para efetuar a análise microbiológica de pontas de cateter centrais, periféricos, arteriais, umbilicais, de alimentação parentérica, entre outros (15). Trata-se de uma técnica semi-quantitativa, que se baseia em fazer rolar o cateter sobre toda a placa do meio de cultura, com ajuda de uma ansa, assegurando que todo o comprimento do cateter está em contacto com este (Figura 1D) (15).

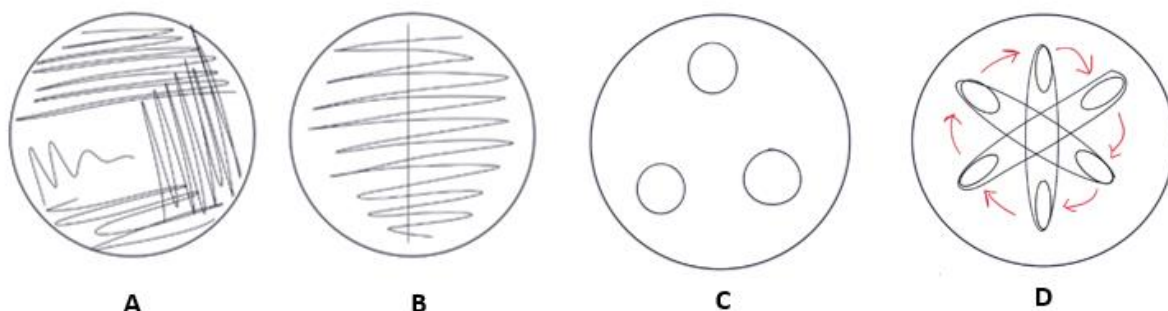


Figura 1 - Técnicas de sementeiras utilizadas no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto Unilabs. Sementeira por: Quadrantes (A), Estria (B), Gota (C) e Rolamento em placa (D).

### 2.3.2.3. Amostras biológicas

A diversidade de amostras biológicas recebidas num laboratório de Microbiologia espelha a complexidade das infeções e doenças que os indivíduos podem contrair. Entre as amostras mais frequentes submetidas a análise encontram-se urina, fezes, exsudados do trato génito-urinário, do trato respiratório inferior e superior, de feridas superficiais e profundas, sangue, unhas e tecidos, líquido cefalo-raquidiano, entre outros, que serão descritos seguidamente.

#### 2.3.2.3.1. Urina

A urina é um fluído biológico estéril excretado pelos rins e eliminado do corpo através do sistema urinário. Possui um papel vital na eliminação de substâncias tóxicas para o organismo e as suas características como a cor, odor e composição, permitem fornecer informações sobre o estado de saúde dos indivíduos (16). As infeções urinárias são um dos tipos de infeções mais comuns nos adultos, especialmente em mulheres (17). Existem diferentes tipos de exames à urina destacando-se a urocultura, urina tipo 1 (EAS - exame dos Elementos Anormais do Sedimento Urinário) e tipo 2, citologia urinária, exame de 24 horas e teste rápido (combur).

Aquando a chegada da amostra de urina ao Setor de Microbiologia, é feita a análise tipo 2 a todas as urinas mesmo àquelas que apenas têm a requisição para Exame Bacteriológico. Esta análise é realizada nos equipamentos em série Sysmex UC, UF e UD. Todas as amostras que possuam requisição de Exame Bacteriológico são sementeadas, normalmente utilizando o meio de cultura CLED (18). Este é o exame utilizado para a identificação, quantificação e estudo de microrganismos presentes na amostra que permite confirmar o diagnóstico de infeção urinária, maioritariamente causada por bactérias.

A valorização dos resultados tem em conta vários fatores estabelecidos, nomeadamente sexo, idade, comorbilidades, terapêutica do doente bem como o historial clínico. Assim, analisando todos estes fatores, os resultados obtidos podem ser considerados: a) Negativo, se o crescimento na placa de cultura for inferior a  $10^5$  UCF/mL ; b) Cultura pura, a valorizar clinicamente se o crescimento for  $10^4$  UCF/mL ; c) Positivo, se superior a  $10^5$  UCF/mL mas com crescimento de mais do que uma espécie de microrganismos de difícil isolamento, polimicrobiano e, normalmente, aconselha-se a repetição da colheita em condições asépticas para confirmar o resultado; d) Positivo, quando o crescimento observado é superior a  $10^5$  UCF/mL, sendo por isso necessário realizar a identificação do microrganismos e posterior antibiograma. Contudo, se se tratar de uma colheita suprapúbica, deverá ser considerado qualquer tipo de crescimento, independentemente da quantificação.

As bactérias frequentemente responsáveis por infeções urinárias são a *Escherichia coli*, as espécies de *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Proteus* (19). Relativamente aos fungos, a espécie mais frequentemente encontrada é a *Candida albicans*, associada a processos de imunossupressão e em doentes sobre terapêutica antimicrobiana (20).

#### **2.3.2.3.2. Fezes**

As fezes são constituídas por uma grande variedade de microrganismos que fazem parte da microbiota natural do intestino grosso. Destacam-se as espécies de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Candida* (24). Contudo, quando se verifica um desequilíbrio imunitário, estes e outros microrganismos podem causar infeções. Deste modo é de extrema relevância a análise de amostras de fezes dado que constitui um fator no diagnóstico diferencial de doenças tais como infeções gastrointestinais. Esta análise inclui Exame Cultural, macroscópico, microscópico, bioquímico e imunológico (22). No Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs pesquisa-se por rotina os agentes *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia* spp.. Primeiramente procede-se ao enriquecimento da amostra num Caldo Rappaport. Seguidamente é feita a cultura das fezes tipicamente nos meios XLD, MacConkey e Campyloset (quando há suspeita de *Campylobacter*), Sabouraud (quando requisitado Exame Micológico). Após 24 horas de incubação, o caldo de Rappaport é passado para um meio de cultura XLD. Por outro lado, também é recorrente a pesquisa em exsudados retais de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbopenemases, em doentes hospitalizados e em cuidados de saúde continuados, como forma de travar a sua disseminação. Para o estudo laboratorial utiliza-se o

meio de cultura seletivo cromogénico, Brilliance CRE Agar que permite a rápida e fácil deteção destes agentes que formam colónias azuis escuras.

#### **2.3.2.3.3. Exsudados do trato génito-urinário**

É possível distinguir quatro tipos de produtos recebidos no Setor de Microbiologia: exsudado endo-cervical, exsudado cervico-vaginal, exsudado uretral e esperma.

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (grupo B) em grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação é comumente utilizado como forma de prevenção de uma possível infeção do recém-nascido durante o seu nascimento. Inicialmente efetua-se a inoculação da amostra num meio líquido de enriquecimento Todd Hewitt durante 24 horas. Após este período recorre-se ao meio de cultura cromogénico Agar Cromogénico Strepto B que através da formação de colónias magentas/violetas permite a rápida e fácil identificação das colónias desta bactéria (23).

Para o diagnóstico de infeções do aparelho genital, através dos exsudados genitais, pesquisa-se por rotina microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e fungos, principalmente *Candida albicans*. Utilizam-se os meios de cultura VCAT, Gelose de Sangue, Gelose de Chocolate e Sabouraud.

A pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp.* é feita com recurso ao kit Mycoplasma IST 2 que permite não só identificar como também testar a suscetibilidade aos antimicrobianos. Este kit possui um frasco com meio de transporte (R1), um frasco de meio de cultura liofilizado (R2) e uma tira plástica com poços para a identificação dos microrganismos mencionados acima bem como para a quantificação bacteriana e teste de sensibilidade para 9 antimicrobianos liofilizados (Doxiciclina, Josamicina, Ofloxacina, Eritromicina, Tetraciclina, Ciprofloxacina, Azitromicina, Claritromicina e Pristinamicina) (24). O meio de transporte contendo a amostra biológica, após homogeneização, é transferido para o frasco R2. Seguidamente, 55µl do meio de cultura são colocados em cada poço do kit, que é selado com vaselina líquida estéril. A cultura é incubada a 35±2°C, sendo feitas duas leituras: a primeira após 24h e a segunda após 48h de incubação. A presença de *Ureaplasma spp.* e/ou *Mycoplasma hominis*, é verificada pela mudança de cor de amarelo para vermelho nos poços de identificação e quantificação (24).

#### **2.3.2.3.4. Exsudados do Trato respiratório superior**

Os microrganismos mais frequentes causadores de infeções no trato respiratório superior são *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (25). São encontrados em exsudados nasais, auriculares e da

orofaringe causando faringite, orofaringite, otite e sinusite. A infeção causada por estes microrganismos é muito comum e pode ser encontrada em todas as faixas etárias (25). Contudo, é mais perigosa nos grupos de risco como nos idosos e crianças. De forma a realizar um diagnóstico célere do agente etiológico da infeção, procede-se à cultura das amostras em meios de cultura como Gelose de Sangue, Gelose de Chocolate e CLED.

Nas amostras nasais é frequente a pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA). Este facto deve-se à prevalência deste microrganismos associado a infeções nosocomiais que devem ser reduzidas e controladas (26). Para esta pesquisa recorre-se a um meio de cultura cromogénico Brilliance MRSA 2 Agar (27).

#### **2.3.2.3.5. Exsudados do Trato respiratório inferior**

Tratando-se o Trato Respiratório Inferior de uma região estéril, as infeções são muito frequentes e acarretam elevadas taxas de comorbilidades. Por este motivo, o diagnóstico rápido e eficiente do microrganismo causador da infeção permitirá um melhor prognóstico, já que poderá ser implementado o tratamento efetivo, e desta forma diminuir a resistência aos antimicrobianos(28).

As secreções respiratórias são submetidas a um Exame Direto através da coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen, e a um Exame Cultural utilizando os meios de cultura: Gelose de Chocolate, Gelose de Sangue, MacConkey e Sabouraud (se requerido Exame Micológico). Neste tipo de amostras os microrganismos frequentemente encontrados são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus* (28).

#### **2.3.2.3.6. Hemoculturas**

Quando há suspeita de uma infeção na corrente sanguínea, o procedimento usado para identificar o microrganismo causador dessa infeção é a Hemocultura (29). Isto deve-se ao facto do sangue ser um produto biológico naturalmente estéril e por isso o surgimento de patogéneos no mesmo levará à ocorrência de uma infeção. A identificação do agente etiológico e a realização dos testes de suscetibilidade aos antibióticos são fundamentais para conduzir a uma terapia efetiva e permitir um melhor prognóstico (30).

O volume de sangue recolhido para as garrafas específicas de hemocultura depende da faixa etária do doente (31). Para as crianças com idade inferior a 1 ano de idade procede-se à recolha de pelo menos 1mL de sangue. Entre o 1 e 6 anos recolhe-se, por punções em sítios distintos, 1mL

por ano de idade dividido por duas garrafas de hemocultura (32). No caso de se tratar de um adulto é necessário recolher 20 mL de sangue de forma a inocular 2 garrafas (uma aeróbia e outra anaeróbia) (29). Cada garrafa possui um sensor químico que deteta a produção de CO<sub>2</sub> causada pelo crescimento dos microrganismos que leva à alteração da cor do meio presente na garrafa e ao alerta de fluorescência no equipamento Bactalert da Biomérieux. Os níveis de fluorescência são medidos de 10 em 10 minutos e sempre que for detetado um aumento de CO<sub>2</sub> o equipamento emite um alerta para que as garrafas sejam retiradas do mesmo. Seguidamente procede-se à coloração de Gram e o produto é semeado em Gelose de Sangue (33).

As espécies de microrganismos frequentemente encontrados em hemoculturas são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* e *Escherichia coli* (34).

#### **2.3.2.3.7. Cateteres**

A análise microbiológica de pontas de catéter inseridas em acessos venosos ou arteriais do doente tem como objetivo detetar a presença de microrganismos e descobrir a possível origem da infeção. As amostras devem ser semeadas em meio de Gelose de Sangue. Os resultados obtidos devem ter em conta os resultados da hemocultura do doente (30).

#### **2.3.2.3.8. Tecidos e exsudados de feridas superficiais e profundas**

Dado que a flora comensal da pele pode interferir nos resultados obtidos do Exame Cultural de exsudados de feridas superficiais, é fundamental ter em consideração aspetos como a história clínica do doente, o local e as condições em que foi realizada a colheita, o Exame Direto – coloração de Gram, e o tipo de microrganismos identificados. Para além da coloração de Gram procede-se também ao Exame Cultural nos meios de cultura Gelose de Sangue, MacConkey e Manitol Salt Agar.

Tratando-se de exsudados provenientes de feridas profundas é de extrema importância valorizar qualquer tipo de crescimento microbiológico, uma vez que foram colhidos de forma asséptica durante procedimentos cirúrgicos ou biópsias (30). Assim, realiza-se o Exame Direto através da coloração de Gram bem como o Exame Cultural, onde se semeia a amostra em Gelose de Sangue, MacConkey e Caldo de Soja.

#### **2.3.2.3.9. Líquidos de Cavidades Naturais**

Os líquidos provenientes do pericárdio, da pleura, da zona peritoneal, sinovial/articular e Líquido Cefalo-Raquidiano (LCR) são examinados através da coloração de Gram e da cultura em meios

como a Gelose de Chocolate, a Gelose de Sangue, MacConkey e Caldo de Soja. Sendo o LCR um fluído biológico intimamente relacionado com o Sistema Nervoso Central (SNC) e com as meninges, é de fulcral efetuar a análise microbiológica com rigor e rapidez (35). Primeiramente devem registar-se as características macroscópicas do produto como a cor, a turvação e o volume. Seguidamente fazem-se duas lâminas com a coloração de Gram e procede-se à inoculação do produto, pelo método de sementeira por gota, em meios como a Gelose de Sangue e a Gelose de Chocolate numa atmosfera de aerobiose durante 24 horas a 37°C.

#### **2.3.2.3.10. Unha, pele e cabelo**

A queratina presente na pele, cabelos e unhas pode ser infetada por fungos tais como *Trichophyton spp.*, *Microsporum sp.* e *Epidermophyton sp.* provocando micoses superficiais/dermatofitoses. De forma a descobrir a etiologia da infeção, são recolhidos fragmentos de unha, pele ou cabelo que seguem para análise micológica no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs(31). Primeiramente, o Exame Microscópio direto sem coloração é realizado com recurso a uma solução de Hidróxido de Potássio, indicada para a pesquisa de fungos especialmente filamentosos (36). Esta solução tem a capacidade de facilitar a análise microscópica uma vez que dissolve o muco e a queratina (37). O meio de cultura utilizado é o meio duplo Mycoline, que é um meio de transporte que possui dois meios: uma face possui Sabouraud, Gentamicina e Cloranfenicol e a outra face contém Sabouraud, Gentamicina e Actidiona (38).

#### **2.4. Identificação de Microrganismos**

Diferentes microrganismos possuem diferentes morfologias e formas de agregação. De acordo com o tipo de morfologia mais comum, é possível identificar mais facilmente o tipo de microrganismos. No Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabsda Unilabs, tive oportuniadde de observar as seguintes morfologias de bactérias e fungos: cocos, cocobacilos, bacilos, filamentosos, helicoidais e vibrios. Relativamente às formas de agregação, os microrganismos podem agregar-se adquirindo formas características como staphylococcos, streptobacillos, streptococcos, diplobacillos, diplococcos, tetradas entre outras. A inspeção visual das colónias é fundamental para uma identificação prévia dos microrganismos uma vez que,

estes dão origem a colónias com características próprias tais como a forma, a elevação, o tipo de bordos, o tamanho, a textura, a pigmentação, a opacidade/transparência (2).

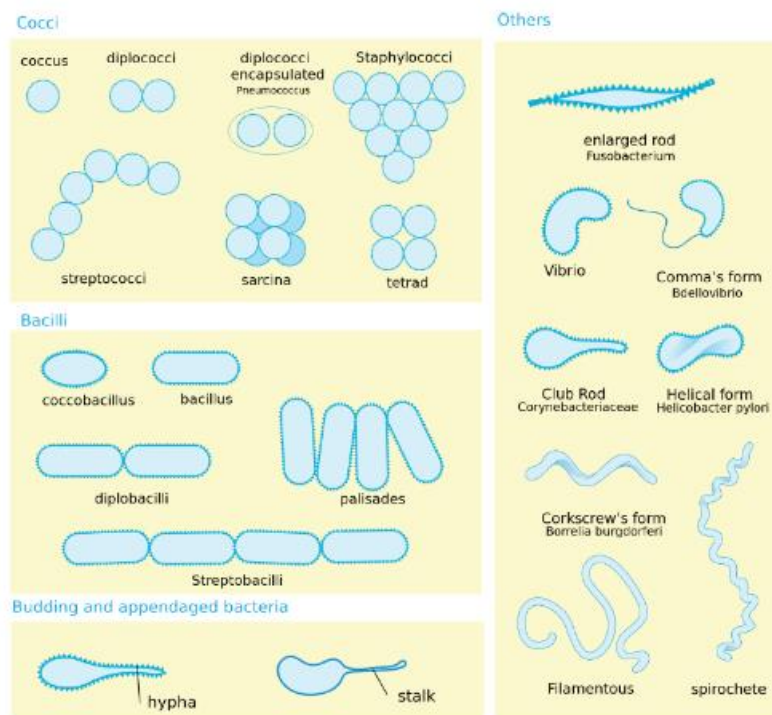


Figura 2 – Diferentes morfologias e formas de agregação dos microrganismos (2).

#### 2.4.1.1. MALDI Biotyper™

O MALDI-TOF revolucionou a identificação bacteriana na última década. É considerado uma tecnologia muito promissora dado que produz resultados num curto período de tempo (aproximadamente 6 minutos). É um método preciso e possui um baixo custo (39). Deste modo, constitui uma mais valia para os laboratórios de Microbiologia que se deparam diariamente com um elevado volume de microrganismos a identificar.

O MALDI-TOF baseia-se em espectrometria de massa que estabelece a relação massa/carga das proteínas constituintes das bactérias (39). Primeiramente as amostras devem ser semeadas em meios de cultura sólidos e incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas até se verificar crescimento dos microrganismos. Seguidamente, procede-se à seleção de uma colónia que é espalhada num dos poços da placa do MALDI-TOF. Adiciona-se matriz em todos os poços e Bactérial Test Standard (BTS), no último poço disponível da placa servindo este como um controlo interno. Após inserir a mesma no equipamento, este inicia o processo de identificação. Através da ionização das proteínas ribossomais da bactéria, o tempo necessário para que essas proteínas ionizadas voem para o detetor, determina a razão massa-carga das proteínas, e a intensidade do

sinal fornece o espectro de massa (padrão). O espectro de massa obtido é observado, e por comparação com a Biblioteca de espécies, o equipamento tem a capacidade de identificar a espécie. De acordo com o score obtido, atribui-se um grau de confiança ao resultado obtido (40).

#### **2.4.2. Testes de Identificação Presuntivos**

Os Testes de Identificação Presuntivos são testes realizados à priori no laboratório de Microbiologia de forma a auxiliar a identificação dos microrganismos presentes nas amostras biológicas. Permite averiguar a presença desses microrganismos através da ocorrência de determinadas reações químicas e colorimétricas. São testes rápidos e de fácil execução contudo, é importante realçar que o seu resultado tem de ser sempre confirmado através de métodos de identificação definitivos(41).

##### **2.4.2.1. Teste da Oxidase**

O teste da oxidase permite distinguir os microrganismos que possuem a enzima citocromo oxidase e que por isso são denominados por oxidase positivos, daqueles que não possuem essa enzima. São exemplos de bactérias oxidase positivas as espécies *Neisseria*, *Moraxella*, *Campylobacter* e *Pausteurella*. Para além disso, todas as espécies de *Pseudomonas* e *Neisseria* são oxidase positivas com exceção de algumas como *P. luteola*, *P. viridiflava* entre outras (42). Este teste utiliza um reagente, tetra-metil-p-fenilenodiamina dihidroclorato, como um doador artificial de eletrões para citocromo c. Assim, quando este reagente é oxidado pelo citocromo c, muda de incolor para azul-escuro ou para um composto de cor púrpura (43). Deste modo, é possível averiguar de forma rápida se os microrganismos em estudo são oxidase positivos e assim distingui-los.

##### **2.4.2.2. Teste da Catalase**

A catalase é uma enzima encontrada na maioria dos organismos aeróbios, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio (44). A libertação de oxigénio é verificada pela formação de bolhas (45). O teste da catalase é fundamental para distinguir bactérias catalase positivas de negativas bem como para diferenciar bactérias aeróbias de anaeróbias obrigatórias (46). É útil para classificar microrganismos pertencentes ao género *Streptococcus* catalase negativa de outros cocos como *Staphylococcus* spp. (45).

#### **2.4.2.3. Kit BD BBL DrySlide™ Nitrocefin**

O kit BD BBL DrySlide™ Nitrocefin é utilizado para a detecção rápida e qualitativa de microrganismos Produtores de Beta-lactamases (47). Quando o substrato, Nitrocefin, é exposto a uma colônia produtora de beta-lactamases, este sofre uma mudança de cor amarela para rosa. Se não estiver na presença deste tipo de microrganismos o substrato da cassette permanecerá de cor amarela (48).

### **2.5. Antibiogramas**

Os antibiogramas enumeram a proporção de microrganismos suscetíveis a determinados antibióticos, numa determinada concentração e durante um período de tempo (49). Estes são extremamente úteis para o fornecimento de orientações para a terapêutica antimicrobiana empírica em situações de elevadas resistências aos antibióticos e para a monitorização de alterações nas resistências ao longo do tempo (49).

#### **2.5.1. MicroScan WalkAway 96 plus**

O MicroScan WalkAway é um equipamento totalmente automatizado que serve para identificar microrganismos, bem como avaliar a sua suscetibilidade a antibióticos através de duas metodologias: Colorimétrica e Fluorimétrica (50). Utiliza concentrações inibitórias mínimas (MIC - concentração mais baixa de antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo) para a detecção de resistência antimicrobiana. Possui um conjunto de painéis (microplacas) de 96 poços que contêm antibióticos para determinar a suscetibilidade a antibióticos de isolados bacterianos (51). Estes painéis necessitam de ser inicialmente incubados no aparelho para haver crescimento bacteriano nos poços dos painéis (cada um com um antibiótico diferente e com diferentes concentrações) (6). Apesar de ter a capacidade de identificar bactérias Gram-negativas fermentadoras e não-fermentadoras, cocos Gram-positivos e *Listeria*, Anaeróbios, Leveduras e microrganismos fastidiosos como é o caso da *Neisseria* e do *Haemophilus* (50). Contudo, no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs esta valência não é usada.

### **2.5.2. Vitek**

O VITEK 2 é um sistema automatizado utilizado no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs para a identificação de microrganismos e testes de suscetibilidade a antibióticos. O sistema encontra-se disponível em três formatos que diferem a nível de capacidade de automação: VITEK 2 compacto, VITEK 2 e VITEK 2 XL. Todos eles possuem as mesmas cartas colorimétricas que são incubadas e posteriormente automaticamente interpretadas (52). Existem 2 tipos de cartas: de identificação e de suscetibilidade (53). A suspensão bacteriana é inoculada nestas cartas, únicas para cada amostra, que possuem vários poços com concentrações crescentes de vários antibióticos. O crescimento do microrganismo é monitorizado continuamente pelo aparelho através da medição de turvação por fluorescência. Os resultados obtidos são comparados com valores padrão que permitem a identificação precisa do microrganismo em causa, bem como da concentração inibitória mínima (CMI) de um antibiótico. Este aparelho possui uma vantagem em comparação com outros equipamentos de identificação microbiana que consiste no facto de medir vários parâmetros num só isolado, tratando-se de uma medição contínua ao longo do tempo. Esta característica confere benefícios para o laboratório de Microbiologia uma vez que torna o processo de identificação e de antibiograma mais célere, mais rentável e preciso (54).

### **2.5.3. Testes de difusão em disco**

O teste de difusão em disco ou ensaio Kirby-Bauer, é um teste quantitativo vulgarmente utilizado nos Laboratórios de Microbiologia com o intuito de avaliar a suscetibilidade de microrganismos a determinados antibióticos. É um teste acessível e de elevada precisão (55). Para inocular os microrganismos é utilizado o meio de cultura Mueller-Hinton. No entanto, se se tratarem de microrganismos fastidiosos é necessário recorrer a um meio de Mueller-Hinton com 5%(v/v) de sangue de cavalo. Assim, o inóculo deve ser espalhado uniformemente em três direções por toda a placa (56). Seguidamente são colocados os discos impregnados em antibióticos na placa de forma espaçada para que não haja sobreposição dos halos e seja possível a correta medição dos mesmos (57). Após a incubação de 16 a 20 horas a 35°C, os halos de inibição devem ser medidos utilizando um instrumento de medição rigoroso e preciso (56). Os diâmetros obtidos devem ser interpretados com base nas regras do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST (58).

#### **2.5.4. Gradiente de Concentração**

Para a realização deste teste é utilizado uma tira de plástico fina, inerte e não porosa em vez dos discos anteriormente mencionados. O E-test combina dois princípios: diluição e difusão para testes de suscetibilidade a antibióticos. Permite assim a quantificação direta da suscetibilidade antimicrobiana apesar de recorrer a um gradiente pré-definido, estável e contínuo de concentração de antibióticos. A tira do E-test possui de um lado uma escala de leitura do MIC em µg/mL e do outro a identificação do antibiótico utilizado. Após o período de incubação, é possível visualizar uma elipse de inibição simétrica dos dois lados da tira. Assim, é possível ler o valor do MIC através da escala e proceder à sua interpretação (59).

#### **2.6. Pesquisa de Anaeróbios**

Os microrganismos anaeróbios fazem parte da microbiota humana. Contudo, podem tornar-se patogêneos oportunistas em determinadas circunstâncias como por exemplo aquando a obstrução do trânsito gastrointestinal. Existem quatro locais principais de infeção por anaeróbios, são eles as áreas pleuropulmonares, intra-abdominal, genital feminina e infeções na pele e nos tecidos moles. As amostras para a pesquisa deste tipo de microrganismos incluem fluídos estéreis como sangue, líquido pleural, sinovial, LCR, amostras provenientes de cirurgias ou de biópsias, fluídos recolhidos através de punção pulmonar e pus de abscessos. O diagnóstico laboratorial deste tipo de amostras é feito por Exame Macroscópico, pela coloração de Gram e pelo Exame Cultural. Assim, o isolamento de anaeróbios deve ser feito num meio de Gelose Sangue. As amostras devem ser incubadas entre 35°C e 37°C numa atmosfera de anaerobiose, criada através de caixas com sacos geradores de anaerobiose (60).

Para a identificação destes microrganismos é de extrema importância garantir que a cultura se encontra pura bem como se deve inocular em simultâneo uma placa de controlo aeróbio e esta deve permanecer estéril (60).

#### **2.7. Pesquisa de Micoplasma e Ureaplasma**

As bactérias dos géneros *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. são organismos comensais que colonizam a mucosa do trato urogenital e estão associados a infeções do trato genital (61). Estes microrganismos não possuem parede celular e não são visíveis através da coloração de Gram dificultando a sua identificação. O ureaplasma diferencia-se do micoplasma pela lise

característica da ureia utilizando como substrato metabólico para gerar ATP. Contrariamente ao micoplasma, o ureaplasma não possui hexoquinase nem arginina deiminase não podendo, por isso, usar glicose ou arginina no seu metabolismo (62).

As espécies mais relevantes são *Mycoplasma hominis* (causadora de endometrite, salpingite e vaginite não específica (63)), *Mycoplasma genitalia* e *Ureaplasma urealyticum* (responsável no homem pela uretrite e nas grávidas por corioamnionite e ruptura prematura das membranas com risco de infecção neonatal (62)). Deste modo, a ocorrência destes microrganismos estão relacionados com a doença uroginecológica (64). De forma a identificar o agente etiológico destas infecções, existem no mercado vários kits de diagnóstico. No Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabsda Unilabs o kit usado para identificação das espécies de *M. hominise* o *U. urealyticum* e suscetibilidade a antibióticos, é o Mycoplasma IST 2. As amostras biológicas são inicialmente misturadas com os reagentes do kit e incubadas durante 24 a 48 horas a uma temperatura entre 36°C e 38°C. Após o período de incubação se a cor do meio sofrer alteração de amarelo para cor de rosa, o resultado é considerado positivo para *M. hominis* ou *U. urealyticum* e ocorre devido ao aumento de pH provocado pelo crescimento do microrganismo. Para além disso, a mudança e intensidade de cor também fornece um índice de resistência antimicrobiana (65).

## **2.8. Testes imunocromatográficos**

Os testes imunocromatográficos são utilizados na rotina do Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs uma vez que fornecem resultados num curto período de tempo e não requerem recursos complexos para os realizar (66). Contudo, a leitura do resultado obtido depende da medição visual, método com alguma subjetividade, pelo que deve ser feito com proficiência. O resultado obtido é assim semi-quantitativo.

Os testes baseiam-se no princípio imunocromatográfico que funciona através da difusão de anticorpos desidratados ao longo da tira de teste. Assim, o resultado é positivo quando se verifica ligação do complexo anticorpo/antígeno formando-se uma banda de cor na tira. Por outro lado, se não se verificar esta ligação não aparecerá a banda colorida na tira sendo por isso o resultado negativo. Para além destas bandas existe em todos os testes a banda controlo que aparecerá sempre que a migração for realizada de forma correta, e que funciona como controlo interno do teste (67).

Dado o aumento da incidência de Organismos Produtores de Carbapenemases, e tratando-se de um problema de Saúde Pública a nível mundial, é imensamente importante identificar este tipo de microrganismos em tempo útil para conter a sua disseminação (68). Para este efeito, existe um teste imunocromatográfico, o teste O.K.N.V.I. RESIST-5 que pertence à gama Coris BioConcept RESIST de antimicrobianos e que é usado por rotina no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs quando há suspeita de Enterobactérias Carbapenemresistentes. Após 15 minutos é possível observar o resultado obtido nas cassetes: se possuir apenas uma banda no controlo, o resultado será negativo mas se possuir banda também nos outros parâmetros o resultado será positivo (68).

Para além do teste supra mencionado, são realizados rotineiramente no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs, o teste BinaxNOW™ Strept A para a deteção quantitativa do antigénio do grupo A *Streptococcus pyogenes* a partir de exsudados nasais bem como testes imunocromatográficos para *Helicobacter Pylori* e Rotavírus em amostras de fezes.

## **2.9. Parasitologia**

As doenças causadas por parasitas foram, ao longo de muitos anos, atribuídas a pessoas oriundas de países em desenvolvimento, que viviam em locais pobres, sem condições de higiene e se encontravam imunocomprometidas devido a terem doenças como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (69). Contudo, também em países desenvolvidos existem infeções parasitárias, maioritadamente devido ao elevado fluxo migratório. Os parasitas podem ser transmitidos de várias formas, nomeadamente por via oral, mucosa, sexual ou através da pele (70). As espécies de parasitas mais comuns, encontradas no continente Europeu são *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *Enterobius vermicularis* (71).

Um parasita é um organismo vivo que vive no interior ou exterior do corpo de um hospedeiro e é a partir dele que retira a sua alimentação e todas as suas necessidades. Os parasitas com valor clínico são os protozoários, os helmintas e algumas espécies de artrópodes. De forma a detetar o agente etiológico da doença parasitária, são analisados diferentes tipos de amostras biológicas (72). No Setor de Microbiologia, analisam-se somente amostras de fezes e exsudados genitais para a pesquisa de parasitas utilizando um microscópio ótico. De realçar que a maioria dos Laboratórios de Microbiologia da Europa estão dependentes de um microscópio para efetuar a análise parasitológica das amostras biológicas. O facto do continente Europeu possuir uma baixa incidência de infeções parasitológicas contribui para um diagnóstico mais moroso e difícil (69).

O Exame Macroscópico e Microscópio das fezes constitui uma etapa relevante do diagnóstico de infecções intestinais causadas por parasitas (73). O Exame Macroscópio consiste na observação da amostra fresca e pesquisa visual de formas parasitárias como por exemplo a presença de larvas visíveis a olho nu (de *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* entre outros). Após a análise macroscópica, procede-se à preparação da mesma para ser visualizada ao microscópio. Utiliza-se o kit ParasiTrap® que possibilita a correta desintegração e suspensão da amostra (74). Para além desta preparação, antes de visualizar uma gota da amostra ao microscópio, é adicionado uma solução salina para que fique menos concentrada e seja possível visualizar melhor a amostra (75). As espécies de protozoários podem ser encontradas nas fezes sob as formas de trofozoítos e cistos, enquanto que os helmintas são frequentemente encontrados sob forma de ovos e larvas (76). Como foi referido, a observação microscópica exige técnicos especializados e com experiência na área para que consigam distinguir os diferentes tipos e formas dos parasitas (71). No Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs os parasitas frequentemente observados neste tipo de amostras são *Endolimax nana* (Figura 3A), *Entamoeba coli* (Figura 3B), *Tneia* spp., *Giardia lamblia* (Figura 3C), *Enterobius vermicularis* (Figura 3D), *Ascaris lumbricoides* e *Entamoeba histolytica*. Nos exsudados genitais (uretral e vaginal) procede-se à procura de *Trichomonas vaginalis* que é um tipo de parasitas transmitido através das relações sexuais e de fluídos genitais (72). O conseqüente aumento de relações sexuais desprotegidas bem como a mudança frequente de parceiros sexuais, são fatores que contribuem para o aumento da presença de *Trichomonas* no aparelho genital feminino e masculino (72).

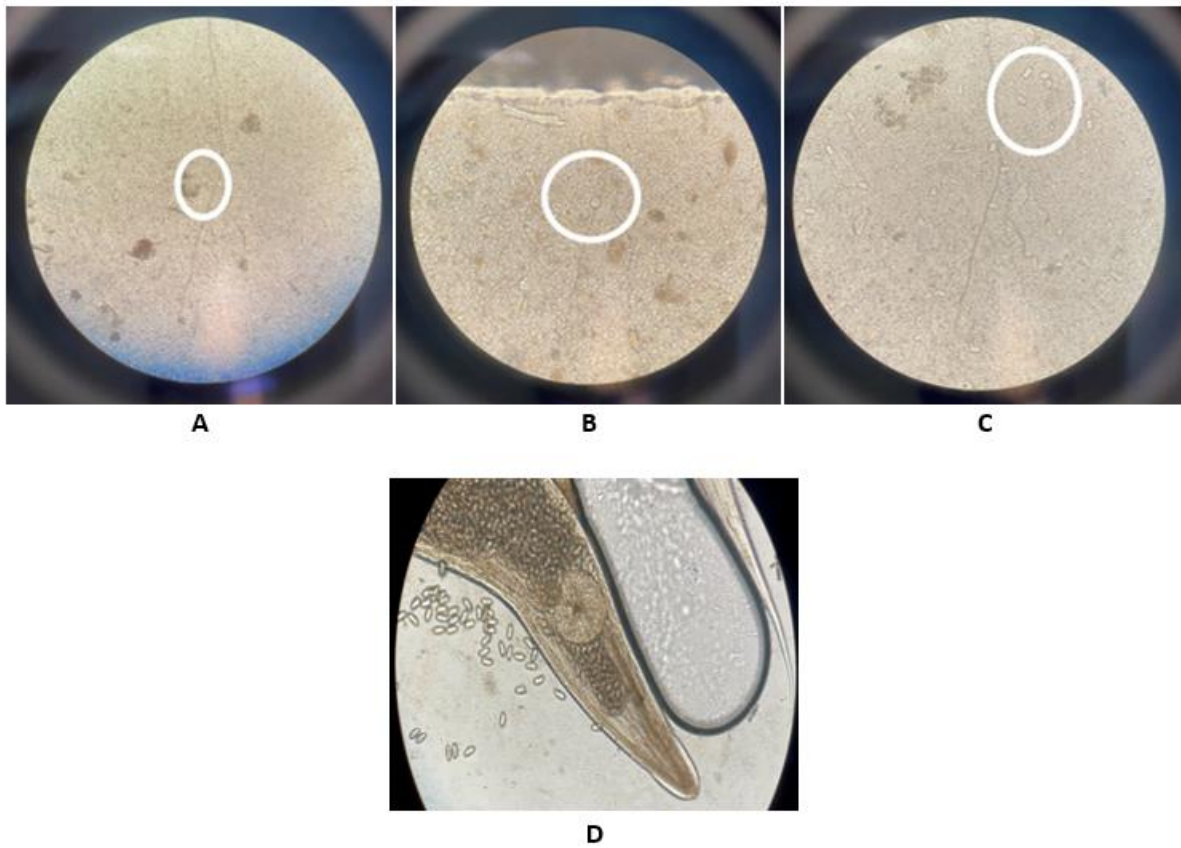


Figura 3 - Parasitas visualizados ao microscópio ótico (ampliação de 40x) durante o Estágio no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto Unilabs. A - *Endolimax nana*; B - *Entamoeba coli*; C - *Giardia lamblia*; D - *Enterobius vermicularis*.

## Caso Clínico-laboratorial de *Nocardia*

Doente do sexo feminino, 33 anos, apresenta requisição médica para estudo bacteriológico de exsudado de uma bolha presente na mão. O exsudado possuía um aspeto turvo com coloração vermelha (Figura 4).

A amostra foi inoculada em Gelose de Sangue (COLS+) e em Sabouraud (Figura 5) sendo ambas as placas incubadas a 37°C durante 24 horas. Em paralelo prepararam-se lâminas do produto coradas pelo método de Gram e de Ziehl-Neelsen. Ao microscópio ótico, na coloração de Gram bem como na lâmina corada pelo método de Ziehl-Neelsen foi possível observar raros bacilos positivos.



Figura 4 - Exsudado da bolha da mão.



Figura 5 - Inoculação do exsudado em Gelose de Sangue e em Sabouraud.

No Exame Cultural, após o período de incubação, a partir da placa de Gelose de Sangue (COLS+) (Figura 6), isolaram-se 3 colónias rugosas de cor branca (Figura 7).



Figura 6 - Sementeira primária em Gelose de Sangue após 24 horas de incubação. Observam-se numerosas colónias rugosas brancas característica de *Nocardia*.



Figura 7 - Presença de 3 colónias rugosas brancas em Gelose de Sangue, obtidas do isolamento feito a partir da 1ª placa de Gelose de Sangue (Fig. 6).

A identificação foi realizada utilizando o equipamento MALDI-TOF, e obteve-se a espécie *Nocardia cyriacigeorgica*. Foram feitas 2 lâminas a partir das colônias, uma corada pelo método de Gram e a outra por Ziehl-Neelsen. Tratando-se esta bactéria de uma bactéria fracamente álcool ácido resistente, utilizando o microscópio ótico para visualizar a lâmina corada pelo método de Ziehl-Neelsen, seria de esperar que as estruturas ramificadas resistissem à descoloração e permanecessem com a cor vermelha, o que não se verifica (Figura 8). Na coloração de Gram observaram-se filamentos ramificados de bactérias Gram-positivo (Figura 9).

Foi realizado todo o estudo solicitado pelo clínico, pelo que não foi realizado estudo de suscetibilidade aos antimicrobianos para o microrganismo isolado.

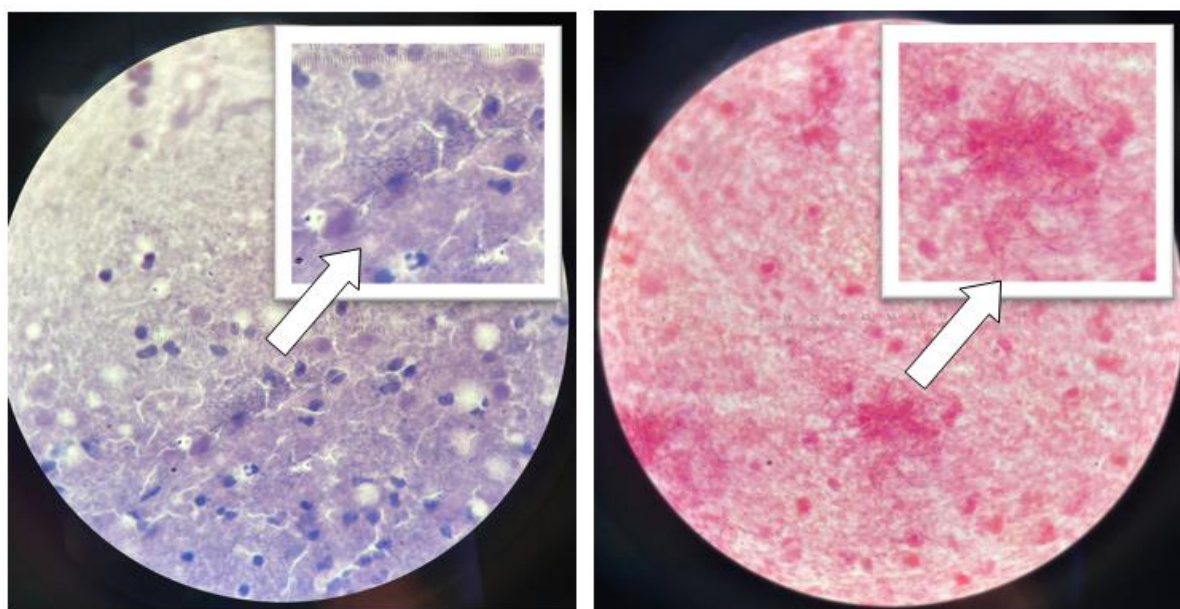


Figura 8 - Coloração de Ziehl-Neelsen das colônias de *Nocardia cyriacigeorgica*.  
Figura 9 - Coloração de Gram das colônias de *Nocardia cyriacigeorgica*.

Este caso foi o primeiro caso de *Nocardia* na pele encontrado pelo Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs. Deste modo, e dada a raridade do caso clínico-laboratorial, a Scoping Review seguidamente apresentada tem como tema Nocardiose cutânea.

## Capítulo II – Nocardiose cutânea em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana

### 1. Introdução

A *Nocardia* é um actinomiceto aeróbio, filamentosos, gram-positivo que contrariamente ao género *Mycobacterium* possui uma cadeia mais curta de ácido micólico (77), e fracamente ácido que se encontra amplamente distribuído pelo solo, água e ar (78). Não pertence à flora normal humana pelo que deve ser examinado (79). Faz parte da ordem Actinomycetales, subordem Corynebactériaceae, família *Nocardiaceae* e ao género *Nocardia* (80). A parede celular dos microrganismos pertencentes à ordem Actinomycetales é do tipo IV e o seu peptidoglicano inclui ácido meso-diaminopimélico, arabinose e galactose (77). Estão descritas mais de 80 diferentes espécies do género *Nocardia*, contudo nem todas elas possuem um potencial patogénico para os seres humanos (81). Destacam-se *N. farcinica*, *N. abscessus*, *N. brasiliensis*, *N. cyriacigeorgica* e *N. nova* como os agentes mais comuns envolvidos em infeções por *Nocardia* em humanos (82). As diferentes características patogénicas, padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos bem como a distribuição geográfica, torna cada espécie de *Nocardia* única e por vezes difícil de identificar (83). De enaltecer o facto do diagnóstico deste microrganismo ser moroso e de existirem diferentes abordagens laboratoriais, dependendo dos recursos de cada laboratório, para efetuar a sua identificação em tempo útil e com a qualidade requerida (83).

A classificação taxonómica bem como a história do género *Nocardia* é considerada complexa e controversa (84). Este facto deve-se às alterações recentes na taxonomia que levaram à reclassificação de algumas espécies de *Nocardia*. Tudo isto teve origem no aumento da disponibilidade de meios de diagnóstico mais sofisticados incluindo a sequenciação genética bem como o uso da tecnologia do MALDI-TOF (81). A primeira descrição deste microrganismo foi realizada pelo veterinário Francês Edmond Nocard em 1888, como um bacilo aeróbico gram-positivo ácido-rápido (85), causador de uma doença bovina com manifestações clínicas como abscessos, danos pulmonares e granulomatose (84). Já em 1889, Trevisan propôs o género *Nocardia* apresentando a espécie *Nocardia farcinica* (84). Em 1896, Eppinger procedeu ao isolamento de um microrganismo filamentosos ramificado a partir de um abscesso cerebral, que apelidou de *Cladothrix asteroides*. Posteriormente, esta estirpe foi renomeada para *Nocardia asteroides* (83).

A *Nocardia* pode infectar diferentes locais do corpo humano. Contudo, as regiões mais frequentes são os pulmões, cérebro e ocasionalmente a pele, através de diferentes vias como inalação, inoculação direta em lesões na pele, entre outras (84). A Nocardiose cutânea pode desenvolver-se de formas distintas como infecção superficial cutânea (infecção primária), micetoma, infecção linfocutânea e infecção disseminada (85). Possui diferentes manifestações clínicas, como a formação de nódulos subcutâneos, abscessos, celulite ou granulomas (82).

A Nocardiose encontra-se relatada em todo o mundo, independentemente da idade, etnia ou sexo (79). Todavia, observa-se uma maior prevalência em indivíduos do sexo masculino (79). Apesar da infecção por *Nocardia* surgir majoritariamente em indivíduos imunocomprometidos e ser considerada uma doença oportunista, indivíduos imunocompetentes também podem ser infectados (82). Os fatores de risco para a infecção são variados, sendo mais frequentes em indivíduos com comorbidades como a diabetes, doença crónica do fígado, cancro, transplante de órgãos sólidos bem como outras doenças que comprometam o sistema imunológico (81).

O prognóstico desta infecção é variável uma vez que está dependente de vários fatores como história clínica do doente, diagnóstico atempado e terapêutica (86). Deste modo, e tendo em conta a raridade de Nocardiose cutânea, é relevante a realização de uma revisão da literatura sobre os fatores a ter em conta aquando de uma infecção por este microrganismo emergente, principalmente em doentes imunocomprometidos como é o caso dos portadores da Síndrome de Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human immunodeficiency virus*).

## **2. Objetivo**

Sistematizar e analisar a literatura existente sobre Nocardiose cutânea em doentes portadores de HIV. Analisar o conhecimento expresso nestes estudos relativamente à epidemiologia da doença, fatores e comportamentos de risco, história e manifestações clínicas, diagnóstico e terapêuticas utilizadas.

Esta revisão da literatura tem como finalidade fornecer informações relevantes e atualizadas sobre Nocardiose cutânea em doentes portadores de HIV, quer para os profissionais da clínica relativamente à acuidade com que realizam a anamnese assim como para os profissionais, que se encontram no laboratório, analogamente às metodologias de inovação de diagnóstico e tratamento eficaz e adequado a cada tipo de laboratório.

### 3. Material e Métodos

Realizou-se uma Scoping Review sobre Nocardiose cutânea em doentes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana. Esta Scoping Review foi realizada seguindo as diretrizes de *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses* (PRISMA) para scoping reviews (85).

A pesquisa da literatura foi preconizada utilizando a PubMed e a Web of Science. Utilizamos as seguintes palavras-chaves: “*Nocardia* infection, skin, HIV, immunologic deficiency syndromes”, sendo a *query*: *Nocardia* infection AND skin AND (HIV OR immunologic deficiency syndromes). A pesquisa foi realizada entre abril e junho de 2023. Não estabelecemos inicialmente nenhum filtro de pesquisa relativo ao tipo estudo de artigo nem ano de publicação. Posteriormente, filtramos os artigos nos seguintes idiomas: português, inglês, francês e espanhol.

Selecionamos os artigos de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos. Os critérios de inclusão compreenderam estudos sobre Nocardiose cutânea, em doentes portadores de HIV, da espécie Humana, e dos idiomas atrás referidos. Efetuou-se a exclusão dos artigos relativos a infeções por *Nocardia* em doentes não portadores de HIV. Da mesma forma, foram excluídos artigos referentes a infeções por *Nocardia* noutras localizações do corpo humano bem como artigos relacionados com outras espécies de seres vivos sem ser a espécie humana.

Seguidamente, eliminamos os artigos repetidos assim como os artigos de revisão. Estes últimos, foram apenas utilizados para a Introdução, momento de contextualização da temática abordada na Scoping Review. Após a exclusão desses artigos, efetuou-se a triagem dos resultados da pesquisa, tendo por base a leitura do título, resumo e palavras-chave. Depois, efetuou-se a leitura integral dos artigos selecionados na etapa anterior, de forma a selecionar aqueles que cumpriam os critérios de inclusão. Procedeu-se ao registo, na Tabela 1, do ano e tipo de estudo, do número de casos, das características da população em estudo (sexo e fatores/comportamentos de risco), da sintomatologia, dos métodos de diagnóstico clínico-laboratoriais e da terapêutica utilizada e respetivas conclusões, nos artigos elegíveis para o estudo.

#### 4. Resultados

A pesquisa efetuada identificou 24 artigos, dos quais 10 eram elegíveis. As datas de publicação variaram de 1991 a 2017 e os estudos foram conduzidos em vários países, incluindo Espanha, Nova Iorque, Austrália, Argentina, Itália e França.

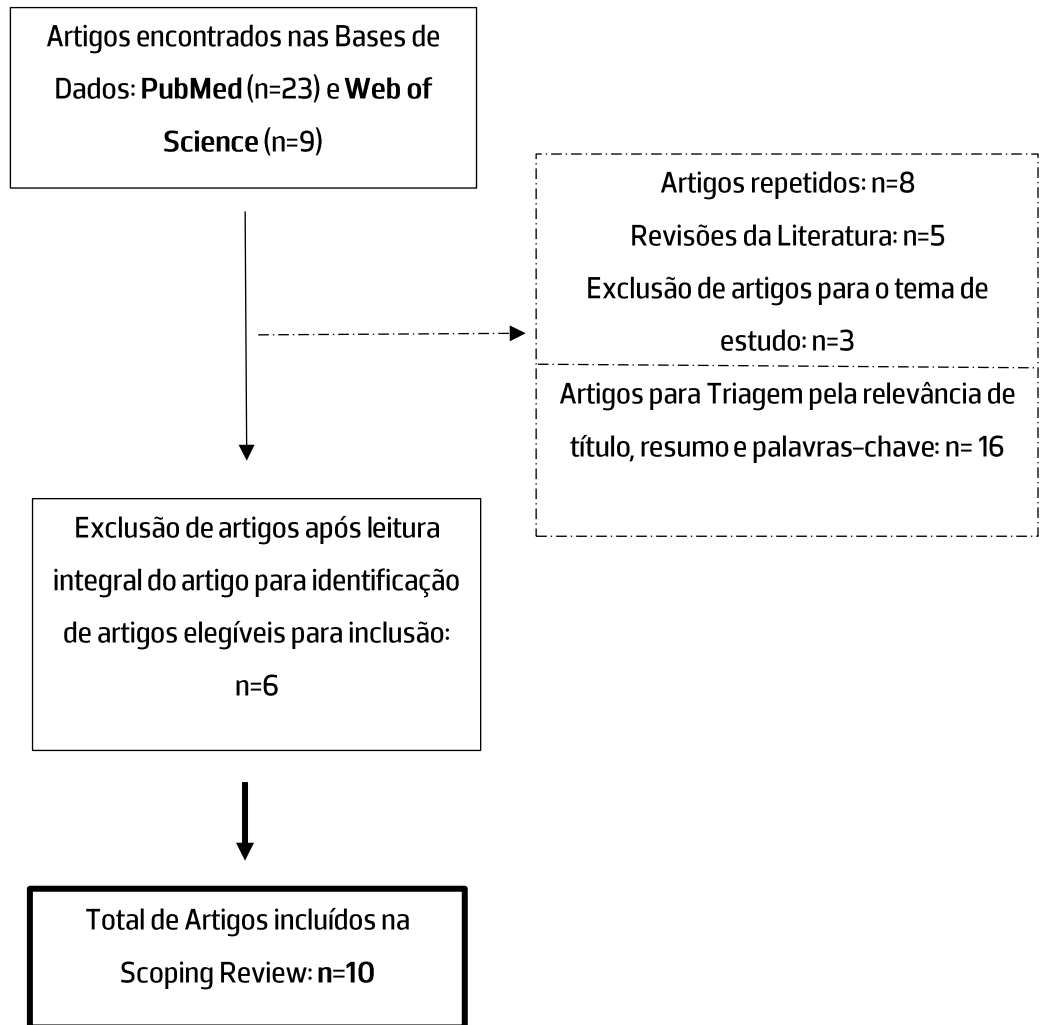


Figura 10 – Esquema relativo à extração de resultados.

Após a extração da informação dos artigos selecionados foram sistematizados na Tabela 1 os artigos e respetivos resultados que respondem ao objetivo do presente estudo.

Tabela 1 – Resumo dos artigos incluídos na Scoping Review

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
1	Cutaneous Nocardiosis and Human Immunodeficiency Virus infection, (87), Case Report, Espanha, 1991	2	- homem de 28 anos, portador de HIV (caso 1); - mulher de 27 anos, portadora de HIV (caso 2); - ambos consumidores de drogas intravenosas.	- dispneia, abscesso no braço e candidíase na boca (caso 1); - múltiplos abscessos na pele (caso 2).	- cultura do tecido da biópsia da pele, em Lowenstein-Jensen, e coloração de Gram e Ziehl Neelsen, positivo para <i>Nocardia asteroides</i> ; - caso 1 – Diagnosticado com Nocardiose cutânea; - caso 2 – Nocardiose ganglionar-cutânea sem disseminação sistêmica.	- administração de sulfadiazina de 6 em 6 horas, no doente do caso 1. Melhorou após terapêutica, com boa evolução da pele dado que as úlceras desapareceram e os pulmões deixaram de estar comprometidos após 2 meses. - sem descrição da terapêutica administrada ao indivíduo do caso 2.	- doentes com Nocardiose cutânea primária geralmente possuem um historial de trauma localizado ou num dos membros; - encontra-se por compreender a razão para o reduzido número de infeções por <i>Nocardia</i> em doentes infetados pelo HIV.
2	Cutaneous Nocardiosis caused by <i>Nocardia nova</i> occurring in HIV-infected individual: A case report and review of literature, (88), Case report e Revisão da literatura, Nova Iorque, 1993	1	- homem de 32 anos e portador de HIV.	- nódulo cutâneo eritematoso no braço esquerdo, sobre local de fratura composta do úmero, há 20 anos.	- nódulo incisado, do exsudado purulento obtido foi feito um esfregaço que foi corado pelo método de Gram; microscopicamente visualizou-se estruturas ramificadas, filamentosas do tipo Gram-positivo; - identificação de <i>Nocardia asteroides</i> .	- sulfonamidas parecem ser o ATB de eleição para tratar infeções por <i>N. nova</i> ; - importante realização de testes de suscetibilidade de antimicrobianos in vitro antes de prescrever ATBs empiricamente; - realça-se a necessidade da realização de testes de diagnóstico adicionais, sensíveis e específicos, que possam ser facilmente realizados em laboratórios de microbiologia clínica, para que infeção por <i>Nocardia</i> seja rapidamente identificada.	- uma das características relevantes que distinguem a <i>N. farcinica</i> de outras espécies do complexo <i>N. asteroides</i> , bem como de outras espécies de <i>Nocardia</i> , é a combinação a combinação típica de suscetibilidade a antimicrobianos, em que o microrganismo é sensível à Eritromicina, moderadamente sensível à Ampicilina e resistente à

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
							Amoxicilina-clavulanato;
3	Disseminated cutaneous nocardiosis a presenting illness of HIV infection, (89), Clinical report, Australia, 1994	1	- homem de 44 anos, portador de HIV e consumidor de drogas intravenosas.	- múltiplos abscessos na pele, no local da agulha; - letargia; - perda de peso; - candidíase oral.	- na cultura do fluido do abscesso cresceu <i>Staphylococcus aureus</i> , sensível a meticilina; - da cultura do abscesso maior, obteve-se um resultado positivo para <i>Nocardia asteroides</i> .	- após identificação de <i>Staphylococcus</i> , iniciou-se tratamento com Flucloxacilina mas abscesso continuou a crescer; doente ficou anémico e com funcionamento anormal do fígado; - depois foi-lhe administrado tomou Flucloxacilina via intravenosa; - após identificação de <i>Nocardia</i> , substitui-se a Flucloxacilina por Trimetoprima-sulfametoxazol; - seguidamente, foi submetido a uma transfusão de glóbulos brancos e substituíram o Trimetoprima-sulfametoxazol por Ceftriaxone; - 18 dias depois, melhorou e iniciou terapia com Zidovudina; - drenagem cirúrgica particularmente importante nos doentes com baixa imunidade. Em suma, o tratamento operatório é reconhecido como um complemento importante da terapia antimicrobiana para a Nocardiose; - alteração dos requisitos da terapêutica para Nocardiose, que passou de uma terapêutica com múltiplos fármacos para uma terapêutica com um único fármaco, com a melhoria da resposta imune alcançada pela Zidovudina.	-Espécies de <i>Nocardia</i> são mais frequentemente isoladas a partir do solo de locais tropicais e subtropicais; - Infecções piogénicas adquiridas no ambiente, provavelmente serão mais graves nos doentes portadores de HIV; - pode levar a um aumento significativo na propagação dessa doença, em pessoas com um sistema imunológico saudável, semelhante ao que se tem verificado com a Tuberculose.
4	Nocardiosis in patients with Human Immunodeficiency Virus infection in Spain, (90), Report + Revisão, Espanha, 1995	2	- sexo dos doentes não especificado; - consumidores de drogas via intravenosa.	- origem da infeção foi cutânea num dos doentes, sobre a área de punção venosa, e pulmonar no outro doente.	- <i>Nocardia</i> isolada de culturas de sangue após 48 horas de inoculação, em meios de cultura standard. - no momento do diagnóstico, apenas 1 doente recebeu profilaxia de ATBs, contra outra infeção, teoricamente eficazes para <i>Nocardia</i> ; - envolvimento cutâneo foi a forma mais comum de Nocardiose, contrariamente ao verificado noutras áreas geográficas. A profilaxia com Trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) contra outras infeções pode ser	- tratamento mais utilizado – Trimetoprima-sulfametoxazol (45%) e Sulfadiazina (36%), com uma boa resposta, exceto em casos com envolvimento cerebral.	- Nocardiose em doentes com HIV é rara em Espanha; - a forma mais comum de manifestações clínicas foram lesões na pele, contrariamente ao verificado em outras partes geográficas; - a profilaxia com TMP-SMX, para

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
					responsável por uma incidência inferior à esperada neste tipo de doentes.		outras infeções, pode ser a causa de uma incidência menor de Nocardiose relativamente ao que seria de esperar em doentes com HIV.
5	<i>Nocardial</i> Infection as a Complication of HIV in South Africa, (91), Estudo Prospetivo, África do Sul, 2000	10	<p>- 6 mulheres/ 4 homens – todos portadores de HIV;</p> <p>- não foi considerado presente o consumo de drogas por via intravenosa em nenhum dos doentes;</p> <p>- no momento do diagnóstico de Nocardiose, nenhum doente estava a receber nenhum antimicrobiano nem medicação antirretroviral;</p>	<p>- 3 doentes com celulite e pus subcutâneo; em 2 isso foi associado à formação do trato sinusal;</p> <p>- locais envolvidos: membro inferior, coxa ou tornozelo.</p>	<p>- amostras de expetoração e pus, coradas pela coloração de Gram e observadas relativamente à presença de estruturas filamentosas ramificadas, que foram acidificadas com a coloração de Kinyoun;</p> <p>- amostras semeadas em MacConkey e agar sangue de cavalo 5%. Placas incubadas durante 48 horas (incubação foi prolongada durante 2 semanas se a microscopia fosse suspeita de <i>Nocardia</i>);</p> <p>- colónias semelhantes a <i>Nocardia</i> spp., foram subcultivadas em Lowenstein Jensen e Middlebrook. Posteriormente foram identificadas recorrendo a reações bioquímicas (resistência à lisozima; hidrólise diferencial de caseína, ureia, tirosina, xantina e hipoxantina; fermentação de açúcares);</p> <p>- com base na cultura de pus, a <i>Nocardia</i> foi considerado o principal patógeno em 2 doentes e um co-patógeno com <i>Staphylococcus aureus</i> no 3º doente;</p> <p>- Teste de susceptibilidade a antibióticos por Microdiluição. ATBs testados: Ampicilina, Eritromicina, Cotrimoxazol, Amoxicilina/ácido clavulânico, Imipenem, Cefotaxina, Amicacina, Minociclina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol e Canamicina.</p>	<p>- Para doentes diagnosticados com Nocardiose cutânea:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 doente tratado com Cotrimoxazol via oral;</li> <li>• 1 doente tratado com Minociclina oral;</li> <li>• 1 doente recusou tratamento médico.</li> </ul>	<p>- Nocardiose ocorre como uma complicação da infeção por HIV, na República da África do Sul;</p> <p>- <i>Nocardia asteroides</i> é a espécie mais frequentemente isolada;</p> <p>- <i>Nocardia farcinica</i> possui resistência a vários agentes antibacterianos;</p> <p>- antimicrobianos que demonstram boa atividade <i>in vitro</i> são a Amicacina, Minociclina, Cefotaxina, Imipenem e Amoxicilina+Ácido clavulânico;</p> <p>- Cotrimoxazol demonstrou elevado nível de resistência <i>in vitro</i>.</p>
6	<i>Nocardial</i> infection in patients infected with the Human	8	<p>- 6 homens/ 2 mulheres;</p> <p>- portadores de HIV;</p>	<p>- úlceras subcutâneas;</p>	<p>- <i>Nocardia</i> isolada em meio de cultura Columbia blood agar, Lowenstein-Jesen e Coletso;</p>	<p>- maioria dos doentes recebeu sulfonamidas tendo havido resposta positiva ao tratamento na maioria dos doentes;</p>	<p>- Nocardiose mantém-se uma infeção oportunista</p>

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
	Immunodeficiency Vírus, (92), Estudo retrospectivo, Espanha, 2003		- consumidores de drogas intravenosas.	- nódulos nos membros superiores.	- espécies identificadas utilizando reações bioquímicas: hidrólise e decomposição da caseína, xantina, tirosina e arilsulfatase, suscetibilidade a cefamandole e outros ATBs; - 3 casos de Nocardiose cutânea.	- o fim do tratamento levou a uma rápida recaída e progressão da doença que normalmente não é resolvida com o retomar da terapêutica; - defendem uma terapia prolongada, provavelmente para a vida em doentes em estado avançado da doença provocada pelo HIV; - elevada taxa de reações adversas às sulfonamidas em doentes com HIV, demonstrando a necessidade de terapias alternativas.	rara em doentes com HIV; - uso de sulfonamidas por rotina, dificulta o diagnóstico microbiológico; - a falta de relatos de casos de Nocardiose bem como o amplo uso de terapia antirretroviral, podem contribuir para a baixa incidência desta infecção relacionada com HIV; - verifica-se uma distribuição semelhante das espécies de <i>Nocardia</i> bem como do espectro da doença, a outros locais geográficos; - destaca-se o facto de embora os resultados deste estudo apontarem para o tratamento com sulfonamidas como sendo eficaz na maioria dos casos, os autores relatam a importância de considerar esta doença como causa significativa de morbilidade e

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
							mortalidade em doentes com HIV.
7	Nocardiosis en pacientes infectados por el VIH, (93), Estudio retrospectivo, Argentina, 2005	27	- 81% homens/19% mulheres; - portadores HIV (nenhum a receber terapia antirretroviral aquando o diagnóstico).	- dor de cabeça; - convulsões; - abscessos subcutâneos; - síndrome linfocutânea; - micetoma; - adenopatia.	- isolamento primário dos exsudados, feito em agar Thayer-Martin e glicerina ou agar sangue e chocolate, incubado a 35-37°C durante um máximo de 21 dias; - culturas positivas foram novamente coradas pela coloração de Gram e de Kinyoun; - testes para identificação dos isolados que permitiram a identificar <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> e <i>N. asteroides</i> - reações bioquímicas: hidrólise da caseína; liquefação de cristais de xantina, tirosina e hipoxantina; produção de urease; crescimento em meio de gelatina a 0,4% e suscetibilidade aos seguintes ATBS (método Kirby-Bauer): Ciprofloxacina, Cefotaxina, Gentamicina, Tobramicina, Imipenem, Cotrimoxazol, Minociclina, Eritromicina, Amicacina, Ampicilina, Ampicilina-sulbactam; - 70% doentes apresentaram isolado respiratório; 11% isolado da pele e tecido subcutâneo; 8% envolvimento do pericárdio; restantes 11% formas disseminadas.	- principal ATB prescrito foi o Cotrimoxazol (78%), Amicacina (59%) e Ciprofloxacina (33%); - terapia combinada (Cotrimoxazole-amicacina) usada em 78% dos doentes; - em doentes com AIDS deve-se manter um esquema de profilaxia secundária com baixas doses de Trimetoprima-sulfametoxazol até atingir reconstituição imunológica com a terapia antiretroviral; - consideram que combinação de ATB é essencial para otimizar as possibilidades de êxito terapêutico, principalmente em doentes com formas graves da doença e/ou disseminada.	- Nocardiose é uma doença pouco frequente em doentes com HIV; - diagnóstico deve ser considerado em doentes com contagem de células T CD4+ inferior a 50/μL e em doentes em que se verifique envolvimento pulmonar ou pericárdico.
8	Nocardiosis in Srinagarind Hospital Thailand, (94), Estudo Retrospectivo, Tailândia, 2005	70	- 80% homens/20% mulheres; - apenas 2 doentes portadores de HIV receberam tratamento antiretroviral.	- febre; - abscessos cutâneos.	- síndrome mais comum: infecção pleuropulmonar seguida da pele e tecidos moles (22,8%); - 70% dos doentes positivos para <i>Nocardia</i> ; - coloração Kinyoun revelou-se muito útil para o diagnóstico principalmente quando não são obtidos resultados provenientes da cultura dos produtos biológicos; - amostras biológicas inoculadas em meios não seletivos de rotina para bactérias, fungos e micobactéria;	- doentes que morreram tinham infecção disseminada, abscessos cerebrais ou infecção por estirpes resistentes ao Trimetoprima-sulfametoxazol; - prognóstico a longo prazo foi bom, com uma taxa de sucesso da terapêutica de 93,75%; 60 doentes receberam tratamento com antimicrobianos, 50 deles com TMP-SMX.	- Nocardiose é uma infecção oportunista frequente em múltiplas condições de imunossupressão; - pode apresentar variadas manifestações clínicas; - a cultura microbiológica pode não ser suficiente para

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
					<ul style="list-style-type: none"> <li>- isolados de <i>Nocardia</i> identificados e testados quanto à suscetibilidade antimicrobiana utilizando o método de difusão em disco com agar Mueller-Hilton;</li> <li>- 49 doentes com cultura positiva de <i>Nocardia</i> spp., dos quais 28 obtiveram coloração negativa. 20 doentes tinham apenas esfregaço positivo como prova de infeção por <i>Nocardia</i>;</li> <li>- teste de suscetibilidade efetuado pelo método de difusão em disco;</li> <li>- taxa de suscetibilidade dos isolados de <i>Nocardia</i> spp. ao Trimetoprima-sulfametoxazol foi de apenas 42,1%.</li> </ul>		identificar a <i>Nocardia</i> . Mas a coloração ácido-resistente modificada é muito útil no diagnóstico; <ul style="list-style-type: none"> <li>- devem ser realizados testes de suscetibilidade a antimicrobianos devido ao aumento de resistência ao TMP-SMX.</li> </ul>
9	Isolation of <i>Nocardia asiatica</i> from cutaneous ulcers of human immunodeficiency virus infected patient in Italy, (95), Case report, Itália, 2007	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- homem de 45 anos;</li> <li>- portador de HIV.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- úlceras na coxa direita;</li> <li>- úlcera reoroauricular no lado esquerdo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- esfregaços primários positivos para <i>Nocardia</i>;</li> <li>- por PCR, obteve-se um resultado 100% de identidade para <i>Nocardia asiatica</i>, suscetível a Imipenem e Trobamicina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- microrganismo sensível a Amicacina, Trobamicina, Gentamicina, Imipenem, Ceftriaxona, Cefotaxina, Lizolida, Doxiciclina, e resistente a Ciprofloxacina e Trimetoprima-sulfametoxazol. Com suscetibilidade intermédia à Claritromicina;</li> <li>- perfil de tratamento ATB difere de espécie para espécie de <i>Nocardia</i>. Contudo, a determinação de MICs para espécies raramente encontradas, é necessária para uma gestão terapêutica correta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- em geral, as suas observações realçam que é essencial não só realizar a identificação precisa da espécie, assim como realizar testes de suscetibilidade antimicrobiana. São aspetos fulcrais para o sucesso da terapêutica de infeções causadas por <i>Nocardia asiatica</i>.</li> </ul>
10	Nocardiosis: A retrospective case series of 19 patients,(96), Estudo retrospectivo, descritivo e unicêntrico, França, 2017	19	- 15 homens/ 4 mulheres.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- febre;</li> <li>- lesão no dedo com fístula;</li> <li>- abscesso na mão;</li> <li>- tosse seca;</li> <li>- pneumopatia;</li> <li>- cefaleia febril.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- todas as estirpes identificadas pelo laboratório de biologia molecular, até 2006, através da determinação do tamanho dos fragmentos obtidos após a restrição do gene da proteína de choque térmico 65 Kd (hsp65) após eletroforese. A partir de 2007, através da sequenciação de uma parte do mesmo gene que codifica a hsp65 com um limiar de interpretação (99% de semelhança);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cerca de metade dos doentes recebeu Cotrimoxazol (em monoterapia ou em combinação com outra classe terapêutica); Este facto está de acordo com a prática habitual, continuando o Cotrimoxazol a ser um dos tratamentos de escolha nos casos de Nocardiose, particularmente na Nocardiose pulmonar.</li> <li>- terapêuticas alternativas, como os Carbapenem ou as Cefalosporinas de terceira geração com ou sem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- este estudo evidencia que a Nocardiose é uma doença difícil de tratar;</li> <li>- é indispensável aprofundar a compreensão sobre este tipo de infeção.</li> </ul>

Nº	Título, Referência, Tipo de estudo, País, Ano	Nº Participantes	Caracterização da amostra	Sintomatologia	Diagnóstico clínico-laboratorial	Terapêutica	Conclusões
					<p>- grande variabilidade no tempo de resposta dos resultados bacteriológicos, de 3 a 95 dias, com uma média de 35 dia.</p>	<p>amicacina, revelaram-se úteis em casos de doença muito grave ou de resistência;</p> <p>- Amoxicilina com ou sem um inibidor da beta-lactamase também pode ser um tratamento alternativo para doentes com doença ligeira, devido à atividade anti-<i>Nocardia</i> moderada;</p> <p>- Minociclina é também uma alternativa interessante em casos de Nocardiose pulmonar ou cerebral;</p> <p>- entre os outros tratamentos, o Imipenem é o ATB com a melhor atividade contra as diferentes espécies de <i>Nocardia</i> (principalmente <i>N. nova</i>, <i>N. veterana</i>, <i>N. africana</i>, <i>N. farcinica</i>, <i>N. transvalensis</i>, <i>N. asteroides</i>, <i>N. cyriacygeorgica</i>, <i>N. abscessos</i>);</p> <p>- nenhum doente foi tratado com Linezolida, que é um tratamento eficaz mesmo para estirpes altamente resistentes, ou com Tigeciclina, outra alternativa interessante;</p> <p>- 4 doentes sofreram reações adversas a medicamentos (27% dos doentes tratados), a maioria dos quais tinha recebido Cotrimoxazol;</p> <p>- na literatura, é frequente a necessidade de alteração do tratamento devido à monitorização de reações adversas, alergia ou intolerância em associação com o Cotrimoxazol. No entanto, este risco de recidiva parece ser maior para os pacientes que receberam menos de 3 meses de tratamento, nomeadamente com Cotrimoxazol. Estes dados confirmam a importância de uma terapia antibiótica a longo prazo de pelo menos 6 meses.</p>	

Da análise de conteúdo presente na Tabela 1 verificamos convergências e divergências relativamente ao tipo de estudo, número de casos, características da população em estudo (sexo e fatores/comportamentos de risco), sintomatologia, métodos de diagnóstico clínico-laboratoriais e terapêutica utilizada. De seguida, apresentamos esses resultados detalhadamente.

### **Tipo de estudo**

Os artigos um, dois, três e nove reportam-se a Estudos de Caso, enquanto os artigos seis, sete, oito e dez são Estudos Descritivos Retrospectivos. Já o artigo cinco é um Estudo Descritivos Prospetivo.

### **Número de participantes**

A maioria dos artigos analisados possuíam uma amostra superior a cinco doentes. Contudo, os artigos dois, três e nove apenas incluíam um doente, e os artigos um e quatro incluíam mais do que um e menos do que cinco doentes.

### **Características dos participantes**

A observação dos estudos selecionados revelou que a descrição da infeção por *Nocardia* apenas em doentes do sexo masculino em três dos artigos examinados, nomeadamente nos artigos dois, três e nove. No artigo quatro, por sua vez, a especificação do sexo dos participantes no Estudo de Caso não foi mencionada. Quanto aos demais estudos, as descrições abrangiam tanto doentes do sexo feminino quanto masculino.

Destaca-se, adicionalmente, que os artigos um, quatro e seis abordaram a associação dos doentes com o uso de drogas intravenosas, apontando para essa variável como um possível comportamento de risco que contribui para o aparecimento de Nocardiose cutânea.

### **Sintomatologia**

Todos os estudos referem a ocorrência de manifestações cutâneas nos participantes. Estas manifestações variam e incluem lesões tais como, úlceras e nódulos cutâneos, abscessos, bem como micetomas (observado apenas no artigo sete) e celulite.

Adicionalmente, os artigos oito e dez corroboram a presença de febre como um sintoma frequente entre os participantes estudados. No contexto específico do artigo três, foi descrito

um espectro mais amplo de sintomas. Para além das lesões cutâneas, os doentes também apresentaram letargia, perda de peso e candidíase oral. No artigo set, são descritos outros sintomas, como a dor de cabeça, convulsões, síndrome linfocutânea e adenopatia.

### **Diagnóstico clínico-laboratorial**

Observou-se da análise dos artigos selecionados, existir uma diversidade de abordagens utilizadas para a identificação da *Nocardia*. No que diz respeito à metodologia usada para o diagnóstico laboratorial da infeção por *Nocardia*, constatou-se que os artigos um, cinco e sete recorreram à cultura dos produtos biológicos, bem como à coloração de Gram. Adicionalmente, o artigo um efetuou ainda a coloração de Ziehl-Neelsen. Por outro lado, o artigo dois optou por utilizar exclusivamente a coloração de Gram. Uma outra abordagem foi o uso da coloração de Kinyoun, reconhecida pela afinidade com microrganismos álcool-ácido resistentes, como a *Nocardia*, que foi adotada pelos artigos cinco, sete e oito. Já os artigos três, quatro, seis e oito fizeram uso exclusivo de culturas de produtos biológicos no processo de diagnóstico da Nocardiose.

Verifica-se que para a identificação das espécies de *Nocardia*, utilizaram-se diferentes metodologias. De salientar que no artigo nove, foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a identificação da *Nocardia*. Também o artigo dez adotou abordagens mais avançadas ao recorrer tanto à Genotipagem como à Fenotipagem.

Outra perspetiva, reside na utilização de Testes Bioquímicos em vários estudos para a identificação das espécies específicas de *Nocardia* responsáveis pelas infeções. A hidrólise da caseína, ureia, tirosina, xantina e hipoxantina, assim como a produção de urilsulfatase e a resistência à lisozima (conforme relatado no artigo cinco), foram aplicados nos artigos cinco, seis e sete.

Foram ainda realizados num conjunto de estudos de suscetibilidade antimicrobiana como parte de sua abordagem de orientação para uma terapia efetiva. Nos artigos dois, cinco, seis, sete, oito e nove, foram conduzidos testes para avaliar a resposta da *Nocardia* a diferentes agentes antimicrobianos.

### **Terapêutica**

No artigo um foi administrada a Sulfadiazina como tratamento para a Nocardiose cutânea tal como no artigo quatro. Contudo neste último, efetuou-se a combinação da terapia com outro

antibiótico, o Trimetoprima-sulfametoxazol. Este antibiótico foi também administrado a 71% dos doentes mencionados no artigo oito. Já no artigo dois e seis, as sulfonamidas foram a escolha preferencial de antibiótico. No entanto, o artigo seis relatou recaídas após o fim do tratamento bem como reações adversas ao antimicrobiano utilizado. Deste modo, defende uma terapia prolongada. Por outro lado, no artigo três, após a identificação da *Nocardia*, os doentes receberam tratamento com Trimetoprima-sulfametoxazol, Ceftriaxona e Zidovudina em diferentes fases do tratamento. Todavia, no artigo cinco, foi administrado Cotrimoxazol em alguns doentes e noutros Minociclina. Já no artigo sete, a combinação de Cotrimoxazol, Amicacina e Ciprofloxacina foi utilizada. A terapia combinada de Cotrimoxazol-Amicacina foi adotada em 78% dos casos, especialmente em doentes com AIDS. A combinação de antibióticos foi considerada essencial para o sucesso terapêutico pelos autores do respetivo artigo. No artigo nove, os autores apresentaram os resultados dos Testes de Suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo o microrganismo identificado sensível a vários antibióticos, incluindo Amicacina, Tobramicina, Gentamicina, Imipenem, Ceftriaxona, Cefotaxima, Lisozima e Doxiciclina. Verificou-se resistência a Levofloxacina e Trimetoprima-sulfametoxazol.

Por fim, no artigo dez, cerca de 50% dos doentes receberam Cotrimoxazol em monoterapia ou em combinação com outros antibióticos. Realça-se a importância da utilização de terapias alternativas, como Carbapenemos ou Cefalosporinas de terceira geração com ou sem Amicacina, em casos graves ou resistentes. O Imipenem foi destacado como eficaz contra várias espécies de *Nocardia*. Foram observadas reações adversas em 27% dos doentes tratados, principalmente com Cotrimoxazol. A necessidade de mudar o tratamento devido a reações adversas foi relatada na literatura, especialmente com o Cotrimoxazol. A terapia antibiótica de longo prazo (pelo menos seis meses) foi considerada importante para prevenir recaídas, tal como já tinha sido mencionada pelos autores do artigo seis.

Além dos resultados anteriormente mencionados, é relevante destacar que os artigos dois e três apresentaram um aspeto diferenciador para com os demais estudos analisados. No contexto da Nocardiose cutânea em portadores de HIV, esses dois artigos adotaram uma abordagem mais abrangente, incluindo a realização de drenagem cirúrgica.

## 5. Discussão

Nesta Scoping Review, a diversidade dos artigos e respetivo desenho espelha uma abordagem variada no que se refere ao estudo da Nocardiose cutânea em doentes portadores do Vírus da Síndrome da Imunodeficiência Humana. Os Estudos de Caso (artigos um (87), dois (88), três (89), quatro (90) e nove (95)) expressam uma perspetiva detalhada sobre a história clínica de cada doente/amostra bem como o tratamento efetuado. Por sua vez, os estudos retrospectivos (artigos seis (92), sete (93), oito (94) e dez (96)) registam uma perspetiva mais ampla e coletiva, possibilitando análises comparativas e a identificação de padrões que podem servir de guia para estratégias de diagnóstico e terapêutica.

A variedade do tamanho das amostras está diretamente relacionada com o tipo de estudo realizado, pelo que a dimensão das amostras condiciona as relações que se podem retirar em cada um desses estudos.

No nosso estudo, verifica-se que a prevalência da infeção por *Nocardia* é superior em indivíduos portadores de HIV, face a doentes imunocompetentes do sexo masculino. O que está em concordância com a literatura que refere que a Nocardiose é mais frequente em homens do que em mulheres, possivelmente devido à exposição ambiental e ocupacional (97–99). Para além disso, é importante mencionar que em alguns artigos do nosso estudo como o um (87), quatro (90) e seis (92), o consumo de drogas intravenosas é associado à Nocardiose cutânea. Essa associação acentua a importância de considerar diversos fatores e comportamentos de risco a ter em conta no momento de diagnóstico bem como a terapêutica a ser prescrita.

A prevalência de Nocardiose está relatada em cerca de 0,47 a 0,87 por 100 000 indivíduos em países como Canadá (100), Espanha (99) e Austrália (101). São vários os fatores que contribuem para a ocorrência de Nocardiose, destacando-se aqueles que provocam o enfraquecimento do sistema imunológico, como transplantes de órgãos sólidos, transplantes de células-tronco hematopoiéticas, HIV, neoplasias hematológicas bem como a terapia crónica com corticosteroides (102).

A Nocardiose pode mimetizar várias outras patologias pelo que a análise efetiva e rigorosa da sintomatologia é fundamental para a identificação da *Nocardia* em tempo útil (79). Cada um dos estudos submetidos a análise, evidência a ocorrência de lesões cutâneas nos doentes. Estas manifestações variam e incluem abscessos, úlceras e nódulos cutâneos, celulite e

micetoma (apenas observado no artigo sete (93)). Assim, as lesões na pele são o denominador comum entre todos os estudos, permitindo desta forma, reforçar a presença destas manifestações na caracterização clínica da Nocardiose cutânea em doentes portadores de HIV. Para além disso é também mencionada a presença de sintomas sistémicos, como a febre (artigos oito (94) e dez (96)) bem como sintomas neurológicos (artigo sete (93)), que contribuem para aumentar a complexidade da sintomatologia associada à infeção causada pela *Nocardia* (99). O aumento da temperatura corporal, como sinal de resposta inflamatória sistémica, é considerado um elemento sintomático de elevada relevância e deve por isso ser tido em consideração no momento do diagnóstico. Sintomas mais abrangentes como perda de peso, candidíase oral e síndrome linfocutânea, destacam a necessidade de ser efetuada uma avaliação detalhada e abrangente dos doentes a fim de serem considerados todos os sintomas como alertas para uma possível infeção por *Nocardia* (103).

O "gold standard" para a identificação da *Nocardia* é o isolamento e cultura da bactéria já o "gold-standart" para a identificação ao nível da espécie é a sequenciação do gene 16S rRNA (77). Contudo, no nosso estudo verifica-se uma diversidade de metodologias empregues para a identificação da *Nocardia* e da sua espécie. Tal pode dever-se ao facto de diferentes estudos possuírem laboratórios com diferentes recursos, nomeadamente no que diz respeito ao tipo de equipamentos que possuem e aos recursos humanos disponíveis.

Como consequência do aumento das infeções por *Nocardia* spp. e da incapacidade de identificar novas espécies através da caracterização fenotípica, tem-se recorrido a técnicas moleculares que permitem a identificação de espécies de *Nocardia* (104). O uso da técnica de PCR, referido no artigo nove (95), constitui assim um avanço significativo na metodologia visto que em comparação com os métodos tradicionais, pode aumentar a especificidade, sensibilidade e rapidez do diagnóstico. Contudo, a sensibilidade desta técnica pode sofrer interferências por vários fatores como a qualidade da amostra e a presença de inibidores. E ainda, a deteção de material genético da *Nocardia* não indica necessariamente a presença de uma infeção ativa. No artigo dez (96), foram adotadas metodologias mais avançadas que incluem a Genotipagem e Fenotipagem. Estas abordagens podem contribuir para uma caracterização mais precisa da *Nocardia*, possibilitando uma melhor compreensão da epidemiologia, resistência e evolução das infeções. Todavia, são técnicas mais dispendiosas que exigem equipamentos especializados, um elevado conhecimento e competência técnica bem como a interpretação dos resultados pode ser complexa. De salientar que o gene 16S

rRNA possui algumas desvantagens, como: i) polimorfismos insuficientes entre as espécies que podem impossibilitar a diferenciação de algumas delas; ii) levar à identificação incorreta das espécies causada pelas inúmeras cópias do gene 16S rRNA em algumas delas (105–107). Com a identificação da espécie de *Nocardia* a partir da realização de testes bioquímicos, é possível direcionar o tratamento adequado. Contudo, algumas espécies de *Nocardia* possuem perfis bioquímicos semelhantes, dificultando a sua identificação. Do mesmo modo, os perfis de suscetibilidade antimicrobiana, introduzidos por Richard Wallace, são um dos métodos para a identificação da *Nocardia* ao nível da espécie. Proporcionam informações cruciais para a antibioterapia a instituir de acordo com a sensibilidade/resistência do microrganismo em causa (105).

Relativamente às metodologias tradicionais, destaca-se a realização de culturas de exsudados conjuntamente com a coloração de Gram, procedimentos estes utilizados em três dos artigos estudados (artigos um (87), cinco (91) e sete (93)). Essa metodologia demonstrou uma abordagem comum para identificar o agente etiológico da infeção a partir da compreensão da morfologia do microrganismo. Porém, os artigos três (89), quatro (90), seis (92) e oito (94), basearam-se exclusivamente da cultura dos produtos biológicos. No artigo um (87), recorreram à coloração de Zielh-Neelsen, com o intuito de visualizarem com melhor qualidade a *Nocardia*, dado esta se tratar de uma bactéria fracamente álcool-ácido resistente e ser bem visualizada através desta coloração. Embora os estudos mencionados anteriormente tenham recorrido a uma metodologia mais complexa, o artigo dois (88) optou apenas por proceder à identificação da *Nocardia* através da visualização ao microscópio do esfregaço corado pelo método de Gram. É uma abordagem possível, todavia pode não ser suficientemente específica quando utilizada em exclusivo, uma vez que a *Nocardia* pode ser confundida com outros microrganismos de estrutura semelhante. A coloração de Kinyoun (coloração de Zielh-Nielson modificada), reconhecida pela afinidade com microrganismos álcool-ácido resistentes (108), foi preconizada nos artigos cinco (91), sete (93) e oito (94).

A escolha da terapêutica utilizada para tratar a Nocardiose cutânea é de máxima importância e deve por isso garantir a resolução da infeção e prevenir possíveis recaídas. No entanto, é importante destacar que não se encontram estabelecidas *guidelines* para o tratamento empírico (109). De acordo com os artigos analisados, verificaram-se diferentes abordagens terapêuticas. A Sulfadiazina foi prescrita no artigo um (87) e quatro (90), tendo a sua eficácia sido provada em alguns casos. Contudo, deve-se alertar para a ocorrência de possíveis

reações adversas assim como para as resistências que possam surgir. O Trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX), sozinho ou combinado, parece ser a primeira opção de tratamento (110). Na nossa Scoping Review, o TMP-SMX, foi utilizado em vários estudos (artigos quatro (90), oito (94), nove (95) e dez (111)), quer isoladamente quer em terapia combinada com outros antibióticos, como a Amicacina. Esta combinação revelou-se eficaz, particularmente em casos graves ou resistentes a outros antimicrobianos. Para além do Cotrimoxazol, em dois artigos (dois (88) e seis (92)) foram usadas outras Sulfonamidas, indicando que estes antibióticos podem ser uma alternativa terapêutica eficaz em casos de Nocardiose cutânea. A terapia antibiótica prolongada (mínimo de seis meses) a fim de evitar recaídas, foi defendida em alguns dos artigos analisados (112,113). De realçar, a abordagem mais abrangente referida pelos artigos dois (88) e três (89) que incluem a drenagem cirúrgica. Revelam que esta prática clínica pode ser realmente importante para melhorar a resolução da infeção, em casos específicos como aquando da existência de nódulos e abscessos cutâneos. Por outro lado, a duração do tratamento, não mencionada em todos os nossos artigos, ainda é algo que se encontra a ser discutido pela comunidade científica, uma vez que deve ser adaptada à resposta ao tratamento por parte do doente assim como a história clínica do mesmo (77).

De acordo com a análise das conclusões dos estudos examinados, denota-se um ponto comum no que concerne à inevitabilidade de aprofundar a compreensão sobre este tipo de infeção de modo a melhorar o prognóstico dos doentes portadores de HIV com infeção por *Nocardia*.

## 6. Conclusão

As infecções bacterianas em doentes infetados pelo HIV, como a Nocardiose, são o culminar direto da resposta imunológica, humoral e celular, do doente. Assim, a Nocardiose cutânea representa uma importante infeção em doentes com HIV.

Esta Scoping Review integrou artigos com abordagem da Nocardiose cutânea em doentes portadores de HIV, com variedade relativamente ao desenho dos estudos. As manifestações clínicas variáveis, incluindo lesões cutâneas e sintomas sistémicos, destacam a relevância de ser efetuado um diagnóstico com precisão e exatidão. A multiplicidade de metodologias de diagnóstico clínico-laboratorial enfatizam a carência de ver desenvolvida uma abordagem integrada e composta por equipas multidisciplinares para que seja efetuada a identificação de *Nocardia*, de uma forma célere e rigorosa, para posteriormente ser prescrita a terapêutica indicada para cada caso específico. Para além disso, as várias opções terapêuticas existentes apontam para a necessidade de um aprofundamento de conhecimentos dada a complexidade deste agente etiológico. A falta de eficácia na prevenção da Nocardiose pode ser devida a fenómenos farmacodinâmicos, mas também ao aumento da resistência antimicrobiana, imunossupressão e comorbilidades.

Por fim, atendendo às características dos estudos analisados, como o tamanho reduzido das amostras e da falta de padronização no diagnóstico da Nocardiose, recomenda-se um desenho de investigação nesta área de forma a aumentar o número de amostras de doentes com HIV infetados pela *Nocardia* que permita contribuir no estabelecimento de diretrizes. Destaca-se a investigação contínua, a padronização das metodologias de diagnóstico bem como a compreensão aprofundada das manifestações clínicas que são essenciais para melhorar a abordagem clínica da Nocardiose cutânea em doentes com HIV. Culminando num diagnóstico de maior precisão e exatidão, um tratamento mais efetivo e a melhoria da qualidade de vida dos doentes infetados pela *Nocardia*.

## Referências Bibliográficas

1. Doron S. Bacterial Infections: Overview. 2008.
2. American Type Culture Collection – ATCC. Introduction to Microbiology [Internet]. 2023. Available from: <http://www.cdc.gov>.
3. Corrêa JA. Garantia da Qualidade no Laboratório Clínico-1. In: 7th ed. 2019. p. 1–150.
4. Valdivieso-Gómez V, Aguilar-Quesada R. Quality Management Systems for Laboratories and External Quality Assurance Programs. In: Quality Control in Laboratory. InTech; 2018.
5. Quality Assurance in Bacteriology and Immunology Third Edition. SEARO . 2012;
6. Kipyegon, R. Comparison of analytical profile index, microscan walkaway 40 plus and bruker maldi biotyper systems for identification of enteric pathogens in Kenya. 2017.
7. Taxonomy M. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Basic Medical Microbiology. 2014.
8. Levy CE, Zoccoli CM, Mamizuka EM, Cavassin ED, Laboratory Fleury, Araujo MRE, et al. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica e Laudo Final. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária | Anvisa, editor. Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. 1ª. 2010.
9. Madison BM. Application of stains in clinical microbiology. Biotechnic and Histochemistry. 2001;76(3):119–25.
10. Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. Biotechnic and Histochemistry. 2001;76(3):111–8.
11. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification. In: Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. Elsevier; 2017. p. 61–73.
12. Sasaki S, Takeshita F, Okuda K, Ishii N. Mycobacterium leprae and leprosy: A compendium. Microbiol Immunol. 2001;45(11):729–36.
13. Coloração ziehl-neelsen [Internet]. Available from: [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)

14. Roque I. Amigdalite estreptocócica: casuística de uma urgência pediátrica. 2021;1–62.
15. Ramos J. Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas. [Coimbra]: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2018.
16. Lourenço C. Diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica: Um estudo no centro hospitalar. Universidade Nova Lisboa; 2012.
17. Szlachta–McGinn A, Douglass KM, Chung UYR, Jackson NJ, Nickel JC, Ackerman AL. Molecular Diagnostic Methods Versus Conventional Urine Culture for Diagnosis and Treatment of Urinary Tract Infection: A Systematic Review and Meta–analysis. Vol. 44, European Urology Open Science. Elsevier B.V.; 2022. p. 113–24.
18. Agar CLED [Internet]. Available from: [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)
19. 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.
20. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. Vol. 22, Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2016. p. 946–57.
21. Levy CE. Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. 1ª. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, editor. 2004.
22. Kasirga E. The importance of stool tests in diagnosis and follow-up of gastrointestinal disorders in children. Vol. 54, Turk Pediatri Arsivi. AVES; 2019. p. 141–8.
23. Ágar Cromogênico Strepto B Instruções de Uso. 2022.
24. Fortunato GB. Avaliação dos resultados das culturas e do perfil de sensibilidade para *Mycoplasma Hominis* e *Ureaplasma spp.* realizadas pelo setor de microbiologia/HU/EBSERH-UFSC no período de 2013 a 2018. [Florianópolis, SC]: Universidade Federal de Santa Catarina ; 2019.
25. Wang L min, Qiao X liang, Ai L, Zhai J jing, Wang X xia. Isolation of antimicrobial resistant bacteria in upper respiratory tract infections of patients. 3 Biotech. 2016 Dec 1;6(2).
26. Kourtis AP, Hatfield ; Kelly, Baggs J, Mu ; Yi, See I, Epton E, et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

- Bloodstream Infections–United States [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr>
27. Product Specification Sheet Brilliance™ MRSA 2 Agar P05310A [Internet]. 2015. Available from: [www.thermofisher.com/contactus](http://www.thermofisher.com/contactus)
  28. Santa Cruz do Sul P. CURSO DE BIOMEDICINA Eduarda Luisa Behling Prevalência de microrganismos e resistência bacteriana em isolados de amostras do trato respiratório de pacientes internados em um hospital filantrópico da região do vale do rio.
  29. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. Vol. 21, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2015. p. 313–22.
  30. 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. 2004.
  31. Mendes S. *Microbiologia e Biologia Molecular em Contexto Hospitalar*. Aveiro; 2019.
  32. Laborclin. Hemocult. In 2019.
  33. BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials Soybean–Casein Digest Broth in a Plastic Vial.
  34. Bard JD, TeKippe EME. Diagnosis of bloodstream infections in children. Vol. 54, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2016. p. 1418–24.
  35. Ferreira Dimas L, Puccioni–Sohler M. Cerebrospinal fluid exam: influence of sample preparation, temperature and time on analytical stability. 2008.
  36. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária., Levy CE. Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: módulo 1. Ministério da Saúde; 2001.
  37. Velasquez–Agudelo V, Cardona–Arias JA. Meta-analysis of the utility of culture, biopsy, and direct KOH examination for the diagnosis of onychomycosis. *BMC Infect Dis*. 2017 Feb 22;17(1).
  38. Biomérieux. From specimen collection to antifungal susceptibility testing – Yeast infections. In.

39. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics–identification of microorganisms and beyond (mini review). Vol. 93, Applied Microbiology and Biotechnology. 2012. p. 965–74.
40. Leal A, De Almeida P, Oliveira G, Totola H, Pimentel J, Sousa P, et al. MALDI-TOF: importância e aplicabilidade na microbiologia hospitalar.
41. Gomes C, López-Matayoshi C, Palomo-Díez S, López-Parra AM, Cuesta-Alvaro P, Baeza-Richer C, et al. Presumptive tests: A substitute for Benzidine in blood samples recognition. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2017 Dec 1;6:e546–8.
42. Phe. UK Standards for Microbiology Investigations Oxidase test–standards–for–microbiology–investigations–smi–quality–and–consistency–in–clinical–laboratories PHE publications gateway number: 2018381 UK Standards for Microbiology Investigations are produced in association with. 2019.
43. Oxidase Test Protocol [Internet]. 2010. Available from: [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
44. Peroxido\_de\_hidrogenio\_Catalase.
45. Teste de Catalase.
46. Catalase Test Protocol [Internet]. 2010. Available from: [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
47. BD–BBL–Dryslide.
48. McKesson. Rapid Test Kit DrySlide™ Microbial Identification Nitrocefin Culture Sample 25 Tests [Internet]. [cited 2023 Mar 27]. Available from: <https://mms.mckesson.com/product/633683/BD-231749>
49. Schulz LT, Fox BC, Polk RE. Can the Antibiogram Be Used to Assess Microbiologic Outcomes After Antimicrobial Stewardship Interventions? A Critical Review of the Literature. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2012 Aug;32(8):668–76.
50. LAFT. Sistema MicroScan “WALKAWAY” PLUS [Internet]. [cited 2023 Mar 27]. Available from: <http://laft.com.br/microbiologia.php>
51. Mcgregor A, Schio F, Beaton S, Alerie Boulton V, Permant M, Gilbert G. THE MICROSCAN WALKAWAY DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY SYSTEM–AN EVALUATION. Vol. 27, Pathology. 1995.
52. Pincus DH. Microbial identification using the BIOMÉRIEUX VITEK ® 2 system [Internet]. Available from: [www.pda.org/bookstore](http://www.pda.org/bookstore)
53. Biomérieux. VITEK ® 2. 2014.

54. Marques M. Avaliação de dois métodos automáticos (Vitek 2 e dRAST) no estudo da suscetibilidade aos antibióticos. [Lisboa]; 2020.
55. Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, et al. Antibioqramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests. *Comput Methods Programs Biomed.* 2017 May 1;143:159–69.
56. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method [Internet]. 2023. Available from: [www.eucast.org](http://www.eucast.org)
57. Hudzicki J. Kirby–Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol [Internet]. 2009. Available from: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
58. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection.* 2014;20(4).
59. E\_test Antimicrobial Susceptibility Testing. bioMérieux SA; 2012.
60. Mellany E, Varela M, De Mestre G, Médica EM. Detecção de bactérias anaeróbias em amostras biológicas por técnicas de biologia molecular. 2018.
61. Suniga De Oliveira J, De NC, Santos S, Falleiros De Pádua RA, Katiany R, Caleffi–Ferraciolli V, et al. Ocorrência de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp.* em amostras genitais de pacientes pertencentes a 15ª regional de saúde do estado de Paraná. 2015.
62. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. *Mycoplasma* and *ureaplasma*. In: *Molecular Typing in Bacterial Infections*. Humana Press Inc.; 2013. p. 229–81.
63. Bio–Rad. *Micoplasma DUO*. 2010.
64. Combaz N, Kuhn A. A systematic review of *mycoplasma* and *ureaplasma* in urogynaecology. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2017;77(12):1299–303.
65. Ozturk S, Yildiz S, Dursun P, Yener Ilce B, Kaymaz O. *Mycoplasma hominis* profile in women: Culture, kit, molecular diagnosis, antimicrobial resistance, and treatment. *Microb Pathog.* 2019 Oct 1;135.
66. Laitinen MP, Salmela J, Gilbert L, Kaivola R, Tikkala T, Oker–Blom C, et al. Method and apparatus using selected superparamagnetic labels for rapid quantification of immunochromatographic tests. Vol. 2, *Nanotechnology, Science and Applications*. 2009.

67. Immunochromatographic techniques\_a critical review.
68. Greissl C, Saleh A, Hamprecht A. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in Enterobacterales by a new multiplex immunochromatographic test. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019 Feb 4;38(2):331–5.
69. Dupouy-Camet J, Olesen OF, Dei-Cas E, Loiseau PM, Mas-Coma S. Perspectives for parasitology and parasitology networks in Europe. Vol. 25, *Trends in Parasitology*. 2009. p. 293–5.
70. Alami A. Market Analysis of Parasitology. Vol. 10, *Market Analysis Archives of Clinical Microbiology*. 2019.
71. Fernández-Rivas G, Rivaya B, Romaní N, Wang JHW, Alcaide M, Matas L. Automated parasitological diagnosis in clinical microbiology laboratories. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
72. Assafa D, Kibru E, Nagesh S, Gebreselassie S, Deribe F, Ali J. LECTURE NOTES Medical Parasitology. 2004.
73. Kotgire Santosh A. Microbiological Stool Examination: Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research [Internet]*. 2012;6(3):503–509:1–7. Available from: [www.jcdr.net](http://www.jcdr.net)
74. Important Use Notices for the ParasiTrap - Diagnostic System - USER MANUAL. 2016.
75. Talha MH. Stool Examination.
76. Basic laboratory methods in medical parasitology. In 1991.
77. Fatahi-Bafghi M. Nocardiosis from 1888 to 2017. *Microb Pathog*. 2018 Jan;114:369–84.
78. Camozzota C, Goldman A, Tchernev G, Lotti T, Wollina U. A primary cutaneous nocardiosis of the hand. *Open Access Maced J Med Sci*. 2017;5(4 Special Issue GlobalDermatology):470–2.
79. Ramos-e-Silva M, Lopes RS, Trope BM. Cutaneous nocardiosis: A great imitator. *Clin Dermatol*. 2020 Mar 1;38(2):152–9.
80. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Current treatment for nocardia infections. Vol. 14, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2013. p. 2387–98.

81. Hemmersbach–Miller M, Catania J, Saullo JL. Updates on Nocardia Skin and Soft Tissue Infections in Solid Organ Transplantation. Vol. 21, Current Infectious Disease Reports. Current Medicine Group LLC 1; 2019.
82. Nocardia yamanashiensis in an indurated nodule on the dorsal hand.
83. Conville PS, Brown–Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of Nocardia Taxonomy and Identification [Internet]. 2017. Available from: <http://www.bacterio.net/index.html>
84. Fatahi–Bafghi M. Nocardiosis from 1888 to 2017. Vol. 114, Microbial Pathogenesis. Academic Press; 2018. p. 369–84.
85. Domic I, Brown A, Magee K, Elwasila S, Kaljevic M, Antic M, et al. Primary Lymphocutaneous Nocardia brasiliensis in an Immunocompetent Host: Case Report and Literature Review. Medicina (Lithuania). 2022 Apr 1;58(4).
86. Sudhaharan S, Kanne P, Vemu L, Devi K, Aparna B. Nocardiosis –A Series of Four Case Reports. Int J Trop Dis Health. 2017 Jan 10;23(2):1–6.
87. Boixeda P, Espafia A, Suarez J, Buzon L, Ledo A. Cutaneous Nocardiosis and Human Immunodeficiency Virus Infection. Int J Dermatol. 1991 Nov;30(11):804–804.
88. Schiff TA, Sanchez M, Moy J, Klirfeld D, McNeil MM, Brown JM. Cutaneous Nocardiosis caused by Nocardia nova occurring in HIV–infected individual: A case report and review of literature. In: Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 7th ed. 1993. p. 849–50.
89. Patel A, Heath T, Bowden F, Fisher D, Currie B. Disseminated cutaneous nocardiosis as a presenting illness of HIV infection. Med J Aust. 1994;161.
90. Sánchez Muñoz–Torrero JF, Yñiguez TR, García–Onieva E, Pascua FJ, Crespo L, Bacaicoa A, et al. Nocardiosis in patients with human immunodeficiency virus infection in Spain. Rev Clin Esp. 1995 Jul;195(7):468–72.
91. Jones N, Khoosal M, Louw M, Karstaedt A. Nocardial infection as a complication of HIV in South Africa. Journal of Infection. 2000;41(3):232–9.
92. Pintado V, Gómez–Mampaso E, Cobo J, Quereda C, Meseguer MA, Fortún J, et al. Nocardial infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. Clinical Microbiology and Infection. 2003 Jul 1;9(7):716–20.
93. Biscione F, Cecchini D, Ambrosioni J, Bianchi M, Corti M, Benetucci J. Nocardiosis en pacientes infectados por el VIH. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23(7):419–23.

94. Mootsikapun P, Intarapoka B, Liawnoraset W. Nocardiosis in Srinagarind Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996–2001. *International Journal of Infectious Diseases*. 2005 May;9(3):154–8.
95. Iona E, Giannoni F, Brunori L, de Gennaro M, Mattei R, Fattorini L. Isolation of *Nocardia asiatica* from Cutaneous Ulcers of a Human Immunodeficiency Virus-Infected Patient in Italy. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):2088–9.
96. Le Coustumier EM, Denes E, Martin C, Weinbreck P. Nocardiose: analyse rétrospective d'une série de 19 cas. *Rev Med Interne*. 2017 Feb;38(2):81–9.
97. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Apr;7(2):213–64.
98. Lerner PI. Nocardiosis, Clinical infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 1996 Jun 1;22(6):891–905.
99. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P. Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine*. 2009 Jul;88(4):250–61.
100. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pépin J. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988–2008. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011 May;17(5):690–6.
101. HUI CH, AU VWK, ROWLAND K, SLAVOTINEK JP, GORDON DL. Pulmonary nocardiosis re-visited: experience of 35 patients at diagnosis. *Respir Med*. 2003 Jun;97(6):709–17.
102. Palomba E, Liparoti A, Tonizzo A, Castelli V, Alagna L, Bozzi G, et al. Nocardia Infections in the Immunocompromised Host: A Case Series and Literature Review. *Microorganisms*. 2022 May 29;10(6):1120.
103. Wilson JW. Bacterial Pathogens. In 2014. p. 91–128.
104. Yamamura H, Hayakawa M, Imura Y. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. *J Appl Microbiol*. 2003;95(4):677–85.
105. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):259–82.
106. Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, et al. secA1 Gene Sequence Polymorphisms for Species Identification of *Nocardia* Species and

- Recognition of Intraspecies Genetic Diversity. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov;48(11):3928–34.
107. Cloud JL, Conville PS, Croft A, Harmsen D, Witebsky FG, Carroll KC. Evaluation of Partial 16S Ribosomal DNA Sequencing for Identification of *Nocardia* Species by Using the MicroSeq 500 System with an Expanded Database. *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):578–84.
  108. Dodiuk-Gad R, Cohen E, Ziv M, Goldstein LH, Chazan B, Shafer J, et al. Cutaneous nocardiosis: report of two cases and review of the literature. *Int J Dermatol.* 2010 Dec;49(12):1380–5.
  109. Dalovisio JR, Pankey GA. In Vitro Susceptibility of *Nocardia asteroides* to Amikacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978 Jan;13(1):128–9.
  110. Smego RA. Trimethoprim–Sulfamethoxazole Therapy for *Nocardia* Infections. *Arch Intern Med.* 1983 Apr 1;143(4):711.
  111. Le Coustumier EM, Denes E, Martin C, Weinbreck P. Nocardiose: analyse rétrospective d'une série de 19 cas. *Revue de Medecine Interne.* 2017 Feb 1;38(2):81–9.
  112. Fernández-Guerrero ML, Torres A, Curiel MD, Soriano F. Successful treatment of nocardial thigh abscess and possible brain abscess with co-trimoxazole. *Eur J Clin Microbiol.* 1985 Aug;4(4):430–1.
  113. Byrne E, Brophy BP, Perrett L V. *Nocardia* cerebral abscess: New concepts in diagnosis, management, and prognosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1979 Nov;42(11):1038–45.
  114. INSTRUCTIONS FOR USE BIOSECTOR XLD AGAR / SS AGAR Ready-to-use bi-plates 1-INTENDED USE In vitro diagnostic device. Selective and differential media for the isolation of Gram-negative enteric pathogens, especially *Salmonella* and *Shigella*, from clinical and non clinical specimens. 2-COMPOSITIONS-TYPICAL FORMULAS XLD AGAR\* SS AGAR\* 3-PRINCIPLE OF THE METHOD AND EXPLANATION OF THE PROCEDURE [Internet]. Available from: [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it),
  115. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO-MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR BD XLD Agar (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose) UTILIZAÇÃO PREVISTA.
  116. Agar Sabouraud.

117. Sabouraud Agar for Fungal Growth Protocols. 2016.
118. Sabouraud Chloramphenicol Gentamicin Actidione Agar 56596.
119. MacConkey Agar - elective and differential medium for detection of Enterobacteriaceae from clinical samples and other materials, according to USP/EP/JP [Internet]. 2015. Available from: [www.liofilchem.net](http://www.liofilchem.net)
120. Allen ME. MacConkey Agar Plates Protocols. 2016.
121. ÁGAR CHOCOLATE [Internet]. Available from: [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)
122. McElhinney R, Millar C, Scopes E. Comparative evaluation of chromID MRSA agar and Brilliance 2 MRSA agar for detection of MRSA in clinical samples. *Br J Biomed Sci.* 2013;70(1):41–3.
123. Product Specification Sheet Brilliance™ MRSA 2 Agar P05310A [Internet]. 2017. Available from: [www.thermofisher.com/contactus](http://www.thermofisher.com/contactus)
124. Brilliance-MRSA-User-Guide-P01210A-P05310A-EN.
125. Brilliance CRE Agar TM [Internet]. 2011. Available from: [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)
126. Kotsakis SD, Petinaki E, Scopes E, Siatravani E, Miriagou V, Tzelepi E. Laboratory evaluation of Brilliance™ CRE Agar for screening carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Performance on a collection of characterised clinical isolates from Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013;1(2):85–90.
127. PP2623 Brilliance™ ESBL/ Brilliance™ CRE Agar [Internet]. Thermo Fisher Scientific©; 2021. p. 1–1. Available from: [www.atcc.org](http://www.atcc.org).
128. CLED Agar (7122).
129. CHAPMAN-MANNITOL SALT AGAR 53647 63844 64134 Meio de Isolamento e Diferenciação Para Estafilococos [Internet]. 2014. Available from: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
130. LOWENSTEIN-JENSEN 55244-69675 MEIO PARA ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS 1-UTILIZAÇÃO PRETENDIDA [Internet]. Available from: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
131. Instruções de utilização-meios em placas prontos a usar bd campylobacter agar (butzler) · bd campylobacter agar (skirrow) utilização pretendida.
132. Rappaport.
133. 510077 - Todd Hewitt - Caldo - AB - 4mL - TB13X100-CX10TB [Internet]. 2019. Available from: [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)

134. Agar Mueller Hinton. Laborclin. 2019;1–5.
135. Agar Mueller Hinton Sangué.
136. Suplemento V.C.A.T. KASVI. 2014;1–1.
137. Technical Specification Sheet Tryptone Soy Broth (NCM0019).
138. Tryptone soya broth.
139. Instructions for use-ready-to-use plated media bd™ columbia agar with 5% sheep blood intended use.

## Anexos

Tabela 2 - Descrição meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Porto da Unilabs

Meio de Cultura	Tipo	Constituição	Utilidade	Incubação
<u>BD XLD Agar</u> (Agar de desoxicolato-lisina-xilose)	Sólido, moderadamente seletivo e diferencial (114).	Possui extrato de leveduras, desoxicolato de sódio, xilose, lisina e um sistema de indicador de H <sub>2</sub> S (115).	Isolamento e diferenciação de elementos patogênicos entéricos Gram-negativos como a <i>Shigella</i> e a <i>Salmonella</i> (115).	18 a 24 horas a 35°C e 37°C (115).
<u>Agar Sabouraud Dextrose</u>	Sólido, seletivo e diferencial (116).	Possui constituintes nutritivos bem como elevada concentração de glicose e pH baixo (que dificulta o crescimento da maior parte das bactérias). As pectonas funcionam como fonte de crescimento de azoto (117).	Isolamento e cultura de todos os fungos (leveduras e filamentosos), patogênicos ou não patogênicos(116).	25 a 42°C 3 a 6 dias até 45-60 dias (116)
<u>Agar Sabouraud Cloranfenicol Gentamicina Actidiona</u>	Seletivo(118)	A associação de antibióticos, cloranfenicol e gentamicina, inibe crescimento bacteriano. A actidiona inibe o crescimento de fungos saprófitas, de determinadas leveduras e algumas estirpes de <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> (118).	Isolamento, a partir de amostras biológicas especialmente quando contaminadas por uma flora fúngica e bacteriana mista, de Dermatofitos e outros fundos patogênicos(118).	Varia consoante o tipo de fungo analisado. Geralmente, a temperatura ótima é de 30-35°C (118).
<u>MacConkey</u>	Sólido, diferencial e seletivo (119).	As pectonas de carne, a caseína e a digestão pancreática da gelatina fornecem aminoácidos, vitaminas, minerais, carbono e azoto que favorecem o crescimento dos microrganismos. O cloreto de sódio é responsável por manter o equilíbrio osmótico do meio. Os sais biliares e o violeta de cristal são agentes seletivos (119).	Isolamento de bactérias Gram-negativas entéricas, permite a diferenciação da fermentação da lactose das bactérias Gram-negativas não fermentadoras de lactose, particularmente membros da família Enterobactériaceae e do género <i>Pseudomonas</i> (120).	Aerobicamente a 35±2°C durante 18-24h (119).
<u>Gelose de Chocolate</u>	Sólido, não seletivo e diferencial (121).	Contém nutrientes nitrogenados na forma de caseína e peptonas de carne, tampão fosfato que mantém o pH e amido de milho utilizado para neutralizar os ácidos gordos presentes no agar (121).	Meio enriquecido com suplemento VX que promove a cultura de bactérias fastidiosas como <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Neisseria</i> spp. (121).	35±2°C durante 18 a 24h. Requer a utilização de geradores de ambiente (CO <sub>2</sub> , anaerobiose ou microaerofilia) (121).
<u>Brilliance MRSA 2 Agar</u>	Sólido, seletivo, diferencial e cromogénico (122).	Fazem parte da sua constituição um mix de pectonas, carboidratos, sais, um cocktail de antibióticos, um mix cromogénico, Kaolin e agar (123).	Cultura e isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina (122). Quando as colónias adquirem a cor azul, o resultado é positivo, se possuírem cores como rosa, roxo ou brancas, o resultado obtido é negativo (124).	Durante 18 a 24 horas a 36 ± 1°C (27).
<u>Brilliance CRE Agar</u>	Sólido, cromogénico (122).	Possui um sistema de dois cromogénios que permite diferenciar o tipo de microrganismos de acordo com a cor das colónias formadas (cor de rosa indica <i>E. coli</i> , se azul será do grupo <i>Citrobacter</i> ) (125).	Deteção de Enterobactériaceae resistentes às carbapenemases (CRE) (126).	Durante 18 a 24 horas a 35°C ± 2°C em ambiente de aerobiose (127).
<u>CLED - Agar Lactose-</u>	Não seletivo, nutritivo e diferencial (18).	Possui nutrientes que são fornecidos pelas peptonas de caseínas, gelatina e extrato de carne bovina. Para além disso tem incorporado	Destina-se à cultura de urina e deste modo promove o crescimento de patógenos das vias urinárias (18).	A 35-37°C durante 18 a 24h (18).

Meio de Cultura	Tipo	Constituição	Utilidade	Incubação
Electrolítico-Deficiente de Cistina (128)		lactose que é uma fonte de energia para o desenvolvimento dos microrganismos com capacidade para a fermentar. O indicador de pH presente é o azul de bromotimol que permite a diferenciação dos microrganismos fermentadores de lactose dos que não possuem essa capacidade. Assim, aqueles fermentadores de lactose reduzem o pH do meio alterando a cor deste de verde para amarelo (128).		
<u>CHAPMAN</u> – Manitol Salt Agar	Sólido, seletivo e diferencial (129).	A presença de cloreto de sódio inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A fermentação de manitol acidifica o meio provocando a alteração da cor do meio para amarelo, indicada pelo vermelho de fenol, o indicador de pH (129).	Isolamento, contagem de <i>Estafilococos</i> e diferenciação entre as espécies fermentadoras e não fermentadoras de mannitol dado que inibe o crescimento de maior parte das bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (129).	Durante 24 a 48 horas a 37°C (129).
<u>Lowenstein Jensen</u>	Sólido e seletivo (130).	Os nutrientes, como o ovo e vestígios, permitem o crescimento das micobactérias (130).	Isolamento, contagem e diferenciação de microbactérias (130).	Durante 28 dias a 37°C numa posição horizontal (130).
<u>Agar BD</u> <u>Campylobacter</u> Butzler	Sólido, seletivo e diferencial (131).	A estabilidade osmótica é mantida pelo cloreto de sódio presente no meio. A pectona, extrato de carne e o sangue de cavalo são fornecedores de nutrientes. Os antibióticos como novobiocina e colistina inibem determinados microrganismos (131).	Isolamento de espécies de <i>Campylobacter</i> provenientes de amostras de fezes (131).	De 42 a 48 horas numa atmosfera microaeróbia a 42°C (131).
<u>Agar Cromogénico</u> <u>Strepto B</u>	Sólido e cromogénico (23).	Possui pigmentos específicos para a diferenciação de <i>S. agalactiae</i> bem como inibidores de bactérias Gram-negativas, anaeróbios e estafilococos (23).	Isolamento e identificação de Estreptococos do grupo B de amostras biológicas (23).	Durante 48h a 36°C±1 (23).
<u>Caldo Rappaport Vassiliadis</u>	Líquido e seletivo (132).	É constituído por pectona como fonte de carbono e nitrogénio para o crescimento das bactérias, cloreto de magnésio contribui para o aumento a pressão osmótica, a verde malaquita inibe os microrganismos que não sejam <i>Salmonellas</i> (132).	Enriquecimento seletivo de <i>Salmonella</i> após o pré-enriquecimento da amostra num meio adequado (132).	Durante 18 a 24 horas a 42°C±2
<u>Caldo Todd Hewitt</u>	Líquido e seletivo (133).	Possui na sua composição pectonas que favorecem o correto crescimento dos microrganismos, dextrose que estimula a produção de hemolisina e tampões para impedir que a hemolisina seja inativada pelo meio ácido. Para além dos antibióticos Gentamicina e ácido nalidixico que favorecem o desenvolvimento de <i>Streptococcus agalactiae</i> provenientes de amostras com microbiota mista (133).	pesquisa de estreptococos beta-hemolíticos do grupo-B, como o <i>Streptococcus agalactiae</i> (133).	Utilização de gerador de CO <sub>2</sub> durante o período de incubação até 48h a 35±2°C (133).
<u>Agar Mueller Hinton Sangue</u> – MHS	Sólido, não seletivo e diferencial (134).	O sangue de cavalo e beta-NAD fornecem os nutrientes para o crescimento de microrganismos fastidiosos. A reduzida concentração de timina e timidina, a presença de iões de cálcio e de magnésico em valores adequados, contribuem para a obtenção de falsos resultados (134).	Crescimento e determinação da suscetibilidade de <i>Streptococcus</i> spp. <i>Listeria</i> spp, <i>Campylobacter</i> spp, <i>Coryneformes</i> e <i>Bordetella</i> spp (135). Destinado aos Teste de Suscetibilidade a antibióticos para microrganismos aeróbios, com base nos padrões definidos	Tensão de CO <sub>2</sub> em estufa bacteriológica entre 35–37°C /18–24h (134).

Meio de Cultura	Tipo	Constituição	Utilidade	Incubação
			pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (134).	
<u>Gelose Chocolate</u> <u>PolyviteX</u> - VCAT	Sólido, seletivo e diferencial (136).	Possui antibióticos na sua constituição como vancomicina, colistina, anfotericina B e trimetoprima que contribuem para o crescimento de <i>Neisseria</i> spp. (136).	Isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> (136).	36 ± 1°C por 48-72 horas em atmosfera de CO <sub>2</sub> (136).
<u>Caldo de Soja</u> <u>Tripton</u> - TSB	Líquido e extremamente nutritivo (137).	O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico, fosfato de dipotássio é o agente tamponante. Enzymatic Digest of Casein e Enzymatic Digest of Soybean Meal são fontes de azoto no TSB. Cloreto Dextrose é a fonte de energia de carbono que facilita o crescimento do organismo (137).	Destina-se à principalmente à cultura de fungos e bactérias, mas não se destina ao diagnóstico clínico (138).	24 horas a 37°C (138).
<u>Columbia Agar</u> (sheep blood 5%)	Sólido, extremamente nutritivo (139).	O sangue de ovelha permite detetar reações hemolíticas e fornece o fator X (heme) fundamental para o crescimento de determinados microrganismos patogénicos. O extrato de levedura fornece vitaminas do complexo B, o amido de milho é uma fonte de energia bem como tem a capacidade de absorver subprodutos tóxicos (139).	Indicado para o crescimento de microrganismos fastidiosos e não-fastidiosos (139).	Durante 18 a 24 horas a 35 ± 2°C em aerobiose (139).