



Cives

Centro de Informação em Saúde para Viajantes

Solicitação e Interpretação de Exames Complementares

Fernando S. V. Martins & Terezinha Marta P. P. Castiñeiras

Texto Técnico – Cives. Departamento de Medicina Preventiva. Faculdade de Medicina da UFRJ, 2016.

Em Medicina a formulação de hipóteses diagnósticas é feita através de informações (dados) obtidas através da anamnese e do exame físico. A solicitação adequada de exames *complementares* (laboratoriais, de imagem), quando necessários para confirmar ou afastar hipóteses diagnósticas, deve ser feita a partir das informações obtidas, ou seja, das hipóteses diagnósticas.

1. Conceitos básicos

A solicitação *adequada* de qualquer *exame complementar* deve ter um objetivo e ser capaz de resultar em uma consequência. Em outras palavras, o médico deve saber *por que* está solicitando um exame e qual a *utilidade do resultado* para o paciente ou para a população. Os exames solicitados sem que estes dois princípios básicos sejam observados são frequentemente inúteis e trazem prejuízos para o paciente ou para a instituição que o atende, por elevarem desnecessariamente o custo do atendimento.

A. Microbioma & microbiota residente

O termo *microbioma* se refere a totalidade da comunidade microbiana, genes e biomoléculas em um ambiente definido. O microbioma humano é composto por diferentes comunidades microbianas – microbiotas - estabelecidas em diversos sítios corporais.

Durante a *gestação* o ser humano desenvolve-se, em circunstâncias habituais, em um ambiente isento de micro-organismos. Ao nascer é *colonizado* por microrganismos (em geral bactérias e fungos) de origem materna e completa a aquisição dos micro-organismos ao entrar em contato com outras pessoas, principalmente nas primeiras semanas de vida. A microbiota humana é essencial à vida e desempenha funções importantes na digestão de alimentos, produção de fatores nutricionais e constitui um importante mecanismo de defesa na proteção contra a invasão por *agentes infecciosos*. Outros micróbios podem servir como oportunistas que tipicamente colonizam o hospedeiro humano sem causar doença, mas alguns destes micro-organismos podem causar infecção em imunossuprimidos ou secundariamente às rupturas dos mecanismos de defesa, ou seja, podem ser *patógenos secundários*.

A *colonização* resulta na presença de micro-organismos em algumas áreas do corpo (pele, boca, oro e nasofaringe, uretra anterior, intestinos etc.), enquanto outras, em condições habituais, são destituídas de microbiota residente (sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, líquido sinovial, tecido celular subcutâneo etc.). É importante destacar que algumas áreas que são habitualmente estéreis têm comunicação com locais que possuem microbiota residente. Assim, o trato respiratório inferior é habitualmente estéril, mas o escarro ali produzido é contaminado quando passa pela oro e nasofaringe, o trato urinário é isento de microbiota, mas não a urina que recebe bactérias durante a passagem pela uretra anterior etc.

O significado clínico do isolamento em cultura de micro-organismos que fazem parte, transitória ou permanentemente da microbiota residente, observados os cuidados de coleta, depende de onde o material foi obtido. Assim, enquanto o isolamento do *Staphylococcus aureus* em culturas de sangue (que é habitualmente estéril) de um paciente com endocardite provavelmente significa a determinação da etiologia, o crescimento da mesma bactéria em

material proveniente de uma lesão de pele (onde existe microbiota), como uma escara de decúbito, não pode ser tomada como expressão da real participação do agente no processo infeccioso.

O isolamento de um agente que habitualmente *não faz parte* da microbiota, como o *Streptococcus pyogenes*, em geral, tem significado clínico mesmo quando o material foi obtido de locais como a orofaringe, que possui uma exuberante colonização bacteriana. Os micro-organismos que não fazem parte da microbiota residente, porém podem causar infecções, são denominados *patógenos primários*.

B. Agentes infecciosos, infecções e doenças

A interação inicial de um micro-organismo com as células humanas pode resultar em *aderência*, que se efetiva mais precisamente entre as adesinas do agente e os receptores das células do hospedeiro [Quadro 1]. O número de receptores na célula hospedeira é limitado para micro-organismos de uma mesma espécie. A existência de receptores livres é condição primordial para a fixação inicial viabilizando, ou não, a colonização subsequente.

Quadro 1: Exemplos de adesinas microbianas e receptores celulares

Adesinas microbianas	Receptores celulares
Lecitinas	Polissacarídeos (ácido siálico, galactose)
Fimbrias/ <i>pilli</i>	Integrinas: VLA-2 (apenas?)
Glicocalix	Proteínas de transporte
Lipídeos	Receptores de complemento
Proteínas do capsídeo viral	Componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina)

A *colonização* é a instalação de micro-organismos de modo permanente ou transitório em nichos ecológicos (pele ou membranas mucosas) do corpo humano, sem qualquer expressão patológica, e que pode, inclusive, resultar em benefício para o hospedeiro.

Infeção é a entrada, com desenvolvimento ou multiplicação, de um *agente infeccioso* em pessoas ou animais que resulta em prejuízo potencial para o hospedeiro. É o resultado da interação não harmônica do agente com o hospedeiro, com consequências anatômicas e fisiopatológicas, que por vezes se expressam através de manifestações clínicas. O termo *infestação*, por outro lado, refere-se ao desenvolvimento e reprodução de *artrópodes* (como pulgas e piolhos) na superfície do corpo (pele, pelos) de seres humanos ou animais.

Agentes infecciosos são micro-organismos (vírus, bactérias, fungos, protozoários ou helmintos) capazes de causar *infecção*. A *infecção* pode ser *inaparente* (assintomática) ou produzir *manifestações clínicas* (doença). As *infecções assintomáticas* podem ser detectadas apenas por exames laboratoriais.

O *período de incubação* é o intervalo de tempo decorrido entre a aquisição da *infecção* e o desenvolvimento das *manifestações clínicas* de uma doença. Pode variar de algumas horas (*cólera*), até dias (*gripe, dengue, difteria, febre amarela, gonorreia*), semanas (*varicela, caxumba*), meses (*hepatites virais, calazar*) ou anos (*hepatites B e C, infecção pelo HIV*).

Agente etiológico é o micro-organismo causador de uma determinada *doença infecciosa*. *Invasividade* é a habilidade de penetração e disseminação de um *agente infeccioso* em um hospedeiro. *Patogenicidade* é a capacidade do *agente* de causar doença. *Virulência* designa o grau de lesão decorrente da ação do *agente infeccioso*.

C. Mecanismos de transmissão dos agentes infecciosos

Os seres humanos são, comumente, a principal fonte dos micro-organismos capazes de infectá-los. A infecção pode ser de natureza endógena, quando o agente invasor é um componente da microbiota residente do próprio indivíduo susceptível (exemplo, *sepses* por *Escherichia coli* oriunda do trato intestinal) ou de natureza exógena, quando o agente invasor

é proveniente de fonte externa (outro indivíduo infectado, água ou alimento contaminado, vetores).

A transmissão dos *agentes infecciosos* de um indivíduo para o outro pode ocorrer de diversas formas. Uma parcela significativa das *infecções* é adquirida basicamente através do contato direto entre a *fonte* (portador do *agente infeccioso*, doente ou *assintomático*) e o *susceptível* (não imune), como ocorre entre parceiros no caso das *doenças sexualmente transmissíveis* (*gonorreia, sífilis, herpes genital, Aids*) e na transmissão vertical da mãe para o filho.

O contato próximo também é fundamental no caso de *agentes infecciosos* que se transmitem através de gotículas de secreção rinofaríngeas (produzidas pela tosse, espirro, no ato de assoar o nariz), tal como ocorre com os agentes da *gripe*, do *sarampo*, da *varicela*, da *caxumba*, da *rubéola*, da *difteria*, da *meningite meningocócica*, entre outros. Além disto, alguns agentes são capazes de permanecer viáveis no interior de pequenas partículas em suspensão no ar (aerossóis) e podem ser inalados por outros indivíduos susceptíveis, mesmo quando a fonte de contaminação ambiental não está inteiramente próxima no momento da transmissão, como ocorre com relativa frequência na *tuberculose*, e por vezes, com o *sarampo* e a *varicela*.

A transmissão pode também ocorrer indiretamente. Certos agentes sobrevivem, e alguns podem multiplicar-se, em veículos como a água e alimentos, que ao serem ingeridos possibilitam a propagação de infecções (*hepatite A, hepatite E, poliomielite, febre tifoide, cólera, diarreias, Doença de Chagas* etc.). Além disto, materiais de natureza biológica (sangue e derivados) também podem veicular a transmissão de infecções (*hepatite B, a hepatite C, Aids, malária, Doença de Chagas* etc.) após transfusões de hemoderivados, acidentes perfurocortantes, exposições de mucosas, compartilhamento de agulhas e de objetos cortantes.

A transmissão pode envolver a participação de vetores, geralmente *artrópodes*. Os *vetores* podem ser *mecânicos*, servindo apenas de meio de transporte do agente até o indivíduo *susceptível* (baratas e moscas podem transportar *Salmonella typhi*) ou *biológicos* (como os *insetos hematófagos*) neles ocorrendo, obrigatoriamente, parte do ciclo de desenvolvimento dos *agentes infecciosos*, tal como ocorre na *malária*, na *febre amarela*, no *dengue*, na *doença de Chagas*.

Alguns agentes infecciosos são encontrados no ambiente, de forma disseminada ou em áreas geográficas restritas. As infecções por estes agentes podem ser adquiridas pelo indivíduo *susceptível* em exposições ocasionais, tal como ocorre no *tétano* (contaminação dos ferimentos com o *Clostridium tetani*) e em algumas *infecções fúngicas* (inoculação pela pele ou inalação).

Um mesmo agente infeccioso pode ser transmitido por mais de uma via, como é o caso, por exemplo, da *raiva* e do *antraz*. Em geral, a *raiva* é transmitida pelo contato direto com animal infectado (mordedura, arranhadura e lambadura de mucosas), mas também pode ser adquirida pela via respiratória em cavernas habitadas por morcegos infectados. O *antraz* que geralmente é adquirido através do contato direto com tecidos ou produtos de animais infectados pode, eventualmente, ser transmitido através da inalação de partículas aéreas (como foi utilizado para a prática de bioterrorismo).

D. Mecanismos de defesa

Os seres humanos são dotados de mecanismos de defesa que dificultam a penetração, a implantação e a multiplicação dos *agentes infecciosos*. A primeira linha de defesa é a mais externa e inclui a barreira mecânica constituída pela *pele* e *mucosas* íntegras, a ação de enzimas presentes na *saliva*, na *lágrima* e nas *secreções nasais*, a *acidez gástrica* e urinária, entre outros mecanismos. Quando um *agente infeccioso* consegue vencer estes obstáculos iniciais, terá de enfrentar a segunda linha de defesa que corresponde a um conjunto de células (*neutrófilos* e *macrófagos*) e substâncias liberadas por células (interferons, citocinas) que agem de forma indiferenciada qualquer microrganismo.

O *sistema imune* (ou *imunológico*) consiste basicamente de um conjunto de células (macrófagos e linfócitos) capazes de reconhecer elementos estranhos ao organismo (*antígenos*) e é capaz de desenvolver dois tipos de resposta (*humoral* e *celular*) que, em geral, podem conferir proteção específica e duradoura contra *agentes infecciosos*. A resposta *humoral* ocorre através da produção de proteínas, denominadas *anticorpos* ou *imunoglobulinas* (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE). A tipo *celular* envolve a produção de células específicas (também linfócitos) cujo propósito é permitir a eliminação do antígeno.

Ao invadir o organismo humano um *agente infeccioso* - que geralmente contém vários antígenos - é reconhecido pelo *sistema imunológico* como *estranho* ou *invasor* e ocorre então a *resposta imunológica primária*, que envolve a produção de *anticorpos* e de *células de memória*. As *células de memória* (linfócitos), em um futuro contato com o mesmo *agente infeccioso*, são capazes de rapidamente voltar a produzir anticorpos específicos (*resposta imunológica secundária*) contra o invasor.

2. Presunção da etiologia de um processo infeccioso

A presunção do diagnóstico de um determinado processo infeccioso deve ter como base essencial e preliminar as evidências clínicas e epidemiológicas. É fundamental avaliar cuidadosamente se houve uma possível exposição a um agente específico (*oportunidade de infecção*) e se o intervalo de tempo decorrido entre a aquisição da *infecção* e o desenvolvimento das *manifestações clínicas* de doença (*período de incubação*) é compatível com uma determinada suspeita diagnóstica.

A maioria dos erros de diagnóstico pode ser evitada pela obtenção cuidadosa da história (clínica e epidemiológica) e do exame físico. Doenças que têm apresentações clínicas iniciais indistinguíveis podem ser suspeitadas pela história epidemiológica (*febre amarela, malária, leptospirose, hantavirose*). As *sepses*, que também podem ter apresentação semelhante, geralmente têm uma porta de entrada detectável.

• Elementos de convicção diagnóstica

A *descrição* das manifestações clínicas (ou laboratoriais) de uma doença infecciosa inclui os eventos que podem ocorrer durante a evolução, mas que não necessariamente vão estar presentes em *todas* as pessoas acometidas. Em vez de *memorizar* a descrição da doença, procure *identificar* os *elementos de convicção* básicos (história clínica/epidemiológica e exame físico) que tornem *obrigatória* a sua inclusão como hipótese diagnóstica a ser investigada. Em outras palavras, identifique os *dados* que *caracteristicamente* estejam presentes em todos os casos de uma determinada doença infecciosa.

Assim, por exemplo, em toda doença febril aguda deve sempre ser considerada a *oportunidade de infecção* para *malária*. A presença de baço palpável é **comum** na *malária*, grave ou não. Logo, a presença ou a ausência de baço palpável não é um *elemento de convicção* que define, *per se*, a inclusão da *malária* como uma possibilidade diagnóstica a ser investigada, uma vez que a esplenomegalia pode ou não ser detectada. De modo semelhante, a icterícia também é um evento **comum** (mesmo nas formas não graves). Portanto, também não é um *elemento de convicção* para a suspeição diagnóstica de *malária*. Além disto, a presença de baço palpável e icterícia também é comum em diversas outras doenças infecciosas.

Em condições naturais, a *malária* transmitida por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Menos comumente a transmissão pode ocorrer através de transfusões, contaminação de soluções de continuidade da pele com sangue, transplantes de órgãos, utilização compartilhada de seringas por usuários de drogas endovenosas etc. Portanto, os *elementos de convicção* para *malária* são a presença de *febre* (um indicativo de infecção) + *oportunidade de infecção* (uma condição que está presente em todos os casos).

Em áreas não endêmicas (como o Rio de Janeiro), ainda que exista o risco de ocorrer eventualmente episódios de reintrodução da *malária*, o dado comum à quase totalidade dos

casos de *malária* é a história de viagem a uma área de transmissão (Região Amazônica, África, Subcontinente Indiano, Sudeste Asiático etc.). Quando não existe relato de viagem a uma área de transmissão, as outras *oportunidades de infecção* (transfusões, uso de drogas endovenosas etc.) devem ser investigadas. Naturalmente, quando o paciente reside em áreas endêmicas (como a Região Amazônica), a *malária* deve ser sempre considerada como uma possibilidade diagnóstica em todas as pessoas que apresentem febre, mesmo quando exista uma outra causa aparente.

3. Fundamentos da coleta e transporte de material biológico

A coleta e transporte de sangue ou outro material de origem humana implica adotar cuidados compatíveis com o procedimento a ser executado para evitar a transmissão de infecções, independente do diagnóstico ou condição do paciente (“*precauções universais*”).

Os exames devem ter processamento adequado e rápido, e resultar em informações úteis para o paciente ou, em alguns casos, para a população. Resultados que ficam disponíveis depois que a pessoa está curada (ou morta) podem ser úteis para outras finalidades (estatísticas, medidas epidemiológicas), mas não para o indivíduo que permitiu que a amostra fosse coletada. Ao se indicar um exame, deve ser claramente explicitado para o paciente qual será sua utilidade e qual o tempo previsto para que o resultado esteja disponível.

A escolha do material representativo da infecção, o volume adequado da amostra, os cuidados com a coleta, com o transporte e processamento de materiais clínicos para exames têm importância crucial. É fundamental que haja uma estreita colaboração entre a clínica e o laboratório, o que implica o conhecimento pelo médico assistente, das possibilidades e das limitações do laboratório, dos seus métodos, suas rotinas e horários de processamento, além da responsabilidade na orientação da coleta de espécimes. Não são confiáveis, necessariamente, os resultados de exames de material clínico coletado, transportado ou processado de forma inadequada.

Sempre que possível, o material biológico a ser coletado para diagnóstico etiológico deverá ser obtido *antes* da introdução de antimicrobianos. Essa medida é particularmente relevante quando o material se destina ao isolamento do agente infeccioso em cultivo, pois a presença do antimicrobiano poderá, além de reduzir a quantidade de micro-organismos na amostra a ser processada, posteriormente interferir com o crescimento *in vitro*. Entretanto, se por alguma razão o início da terapêutica antimicrobiana já tiver ocorrido e não houver possibilidade clínica de interrupção do esquema, isso não deverá impedir a realização de culturas ou de outros exames que estiverem indicados. Nestas circunstâncias é fundamental que o laboratório de microbiologia esteja ciente das drogas em uso, de forma a adotar metodologias alternativas para minimizar o efeito negativo dos antimicrobianos sobre o rendimento das técnicas de isolamento em cultivo.

De uma forma quase que intuitiva, a amostra biológica que melhor deverá se correlacionar com um determinado processo infeccioso será aquela obtida diretamente do local predominantemente acometido ou produzida a partir dele. Isso porque, o esperado é que o material biológico proveniente do foco primário contenha o agente infectante em maior número, tornando mais fácil demonstrar sua presença, seja por método direto ou por cultivo. Contudo, ainda que correta para a maioria das situações, a correlação nem sempre se aplica e, algumas vezes é importante conhecer as características peculiares do agente presumido. É difícil, por exemplo, demonstrar ou isolar *Legionella* spp através do escarro, mas o diagnóstico de pneumonia por *Legionella* pode ser realizado com relativa facilidade pela detecção de antígeno específico na urina. Outro aspecto relevante é a facilidade (ou não) de obter o material potencialmente elegível, visto que poderão ser necessários procedimentos invasivos, com riscos inerentes e nem sempre justificáveis.

As dúvidas em relação aos procedimentos corretos para a coleta, volume adequado a ser obtido, conservação e transporte de material biológico para o laboratório, devem ser esclarecidas antecipadamente. É importante evitar erros (comuns) como “esquecer” por horas no balcão da enfermaria amostras de urina colhida por micção espontânea, pois a intensa proliferação bacteriana tornará impossível a interpretação do resultado. Por outro lado, não se deve refrigerar frascos contendo líquidos serosos (cefalorraquidiano; sinovial) ou hemoculturas após inoculação (pode inibir crescimento) e ainda, a refrigeração de materiais (*swab* uretral, aspirados) destinados a culturas para *Neisseria gonorrhoeae* praticamente inviabiliza o isolamento (perda de viabilidade bacteriana).

É desejável que instruções para coletas diferenciadas estejam facilmente acessíveis. Além disto, é essencial que o médico envie para o laboratório as informações clínicas pertinentes junto ao material a ser processado. Cabe ao laboratório, informar ao clínico os resultados dos exames tão logo disponíveis, mesmo quando iniciais ou parciais. O conhecimento das características morfológicas de uma bactéria (cocos gram-positivos agrupados em cachos, bastonetes gram-negativos etc.) isolada em hemocultura, pode ser extremamente importante para a condução de um caso de uma pessoa com *sepsis* ou *endocardite*, mesmo antes da identificação completa e da realização do antibiograma.

É recomendável, em geral, que as amostras de material biológico sejam colocadas em recipientes estéreis sem resíduos de detergentes, desinfetantes, antibióticos ou anestésicos, pois até mesmo traços destas substâncias podem ter efeito inibitório sobre o crescimento de micro-organismos. Por vezes, como no caso do sangue, as amostras são inoculadas diretamente em frascos com meios de cultivo apropriado, imediatamente após coleta. Além disso, frascos contendo meio de cultura podem ser úteis para transporte de amostras que não serão imediatamente processadas.

Todos os recipientes (frascos, tubos, lâminas, *swabs* etc.) contendo amostras biológicas para diagnóstico devem ser cuidadosamente identificados no momento em que forem obtidos, para que não reste *qualquer* dúvida quanto à identificação do *indivíduo fonte* e sua *localização*, e quanto à *natureza do material* e ao *momento da coleta*. Os dados contidos nestes recipientes devem estar de acordo com a solicitação médica do exame. Números de registros (prontuário, inscrição no laboratório) devem constar em ambos. Materiais encaminhados ao laboratório sem que estes cuidados tenham sido adotados devem ser rejeitados. No pedido, além das informações clínico-epidemiológicas do paciente, é importante que o médico solicitante se identifique de forma clara e forneça alternativa de contato (telefone, ramal, *fax*, *e-mail*) para facilitar a troca de informações com o laboratório.

A. Coleta de material em áreas que possuem microbiota residente

A cultura de material coletado de locais que possuem uma microbiota residente, com frequência tem pouca utilidade clínica em razão da possibilidade de contaminação. Nestas circunstâncias ocorre, quase que sistematicamente, o crescimento de uma ou de várias bactérias, e nem sempre é possível determinar pelos métodos bacteriológicos convencionais qual a relevância do isolamento, ainda que resultados aparentemente mais acurados possam ser obtidos através de culturas quantitativas. Contudo, quando se procura um agente que não faz habitualmente parte da microbiota, ou seja, um *patógeno primário*, as culturas de materiais destas regiões podem resultar na confirmação etiológica do diagnóstico clínico.

• Lesões cutâneas

A pele é dotada de numerosa microbiota residente. Em razão disto, a coleta de material superficial (*swab*, raspado) de lesões abertas nas quais podem estar envolvidos agentes que fazem parte da microbiota residente (de forma transitória ou permanente), em geral, tem pouca ou nenhuma utilidade.

Em material obtido de lesões como úlceras de decúbito e pé diabético, quase que sistematicamente, ocorre o crescimento, isolado ou em associação, de bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp. *Pseudomonas* sp. e anaeróbios, sem que seja possível determinar a real participação patogênica de cada uma no contexto clínico. A cultura de material obtido destas lesões, no entanto, pode ser útil quando existe pus coletado em loja, ou quando a porção mais profunda da base de uma lesão pode ser aspirada através da pele sadia.

As culturas, no entanto, são bastante úteis e com resultados que têm valor confirmatório, no caso de lesões ulceradas que têm agentes etiológicos que habitualmente não fazem parte da microbiota de pele, como *ectima* (*Streptococcus pyogenes*) e *difteria cutânea* (*Corynebacterium diphtheriae*). São úteis também no caso de lesões fechadas, como bolhas, abscessos, furúnculos e celulites, desde que o material seja obtido por aspiração com seringa e agulha estéreis.

- **Oro e nasofaringe**

A oro e nasofaringe possuem numerosa microbiota residente. A bacterioscopia pelo Gram de materiais coletados destes locais não tem, em geral, utilidade clínica, pois não permite a diferenciação morfotintorial entre os patógenos e os componentes da microbiota habitual e nenhum recurso laboratorial quantitativo foi estabelecido de modo a tornar possível uma correlação acurada. As culturas, no entanto, são úteis quando o agente etiológico presumido não faz parte, habitualmente, da microbiota local, como nos casos de suspeita de *amigdalite estreptocócica* (*Streptococcus pyogenes*) e *difteria* (*Corynebacterium diphtheriae*). Também são úteis na identificação de portadores assintomáticos de agentes potencialmente capazes de causar doença (patógenos primários), mesmo em indivíduos sem aparente comprometimento das defesas imunológicas, como *C. diphtheriae* e *Neisseria meningitidis*.

- **Trato respiratório inferior**

O trato respiratório inferior não tem microbiota residente. A microbiota da orofaringe, contudo, contamina o escarro expectorado (espontaneamente ou após indução), o que pode tornar pouco confiável o resultado de culturas. A contaminação (em maior ou menor grau) também ocorre quando o material é obtido por aspiração endotraqueal ou mesmo pelo lavado bronco-alveolar, em função da passagem, do material ou do dispositivo de coleta, pela orofaringe. As culturas, no entanto, são úteis no caso de suspeita de doenças, como a *tuberculose*, causadas por agentes que não façam parte da microbiota residente local.

Não obstante a presumível contaminação da secreção expectorada, uma amostra de escarro adequadamente colhida e corada pelo método de Gram poderá ser extremamente útil na avaliação etiológica das *pneumonias*. Na análise da bacterioscopia pelo Gram do escarro, a primeira etapa consiste em verificar a representatividade da amostra colhida (pouca ou nenhuma célula epitelial e presença significativa de neutrófilos e macrófagos). Uma vez caracterizada a amostra como representativa de secreção do trato respiratório inferior, procede-se a avaliação quantitativa e morfotintorial da bactéria predominante e a sua localização intra e extra-leucocitária. Em um Gram de escarro com mais de vinte e cinco polimorfonucleares e menos de dez células epiteliais por campo de 100 aumentos, portanto representativo, o predomínio (observado na imersão) de cocos gram-positivos agrupados em pares, alguns intraleucocitários, sugere fortemente o *Streptococcus pneumoniae* como agente etiológico.

A interpretação das culturas de escarro exige cautela e é fundamental que os resultados das culturas sejam interpretados em conjunto com os achados das bacterioscopias iniciais. Nos casos em que seja desejável realizar cultura para a obtenção de antibiograma (pneumonias graves, possibilidade de agentes resistentes às drogas usuais, presença de comorbidades que representam gravidade potencial, como alcoolismo e pneumopatias estruturais), essa deve ser

sempre precedida pela realização da bacterioscopia pelo Gram. A análise bacterioscópica preliminar também evitaria que amostras não representativas, geralmente decorrentes de coleta inadequada, fossem desnecessariamente semeadas.

Ainda que sejam empregadas culturas quantitativas, ou seja, com quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, os resultados obtidos não devem ser interpretados de forma acrítica [Quadro 2] e os achados do isolamento, quando clinicamente significativos, devem ser coerentes com a demonstração direta pelo Gram. Nestas circunstâncias, adicionalmente, está indicada a realização de hemoculturas.

Quadro 2

Material de origem respiratória: cultura quantitativa

Material processado	Contagem de UFC/mL significativa
Escarro	≥1.000.000
Aspirado endotraqueal	≥ 100.000
Lavado bronco-alveolar (BAL)	≥ 10.000
Escovado brônquico protegido	≥ 1000

A tendência a não realizar Gram de escarro pela ideia de não confiabilidade resulta do desconhecimento de que o exame é simples, de baixo custo, rápido e produz informações úteis e confiáveis. Além disto, mesmo quando o Gram é solicitado, não raramente os laboratórios deixam de realizar o exame prontamente, o que pode tornar o resultado sem utilidade. A solicitação sistemática e a realização imediata do Gram poderia contribuir para a escolha correta do tratamento, redução de custos e diminuição do impacto para a população resultante do uso inadequado de antibióticos.

• Trato urinário

Os rins, os ureteres, a bexiga e a porção proximal da uretra são habitualmente isentos de micro-organismos, porém a porção distal da uretra (ou uretra anterior) possui numerosa microbiota residente. Em razão da contaminação durante a micção por bactérias da uretra anterior, a urina obtida espontaneamente não é estéril. Para minimizar a contaminação, o primeiro jato de urina deve ser desprezado, utilizando-se o segundo (jato intermediário, jato médio). Não há benefício comprovado de forma inequívoca na higienização da genitália (feminina inclusive) imediatamente antes da coleta. O procedimento pode, por vezes, estimular a micção imediata, o que dificulta o procedimento de coleta quando é utilizada a primeira urina da manhã e a bexiga está repleta, particularmente em indivíduos sintomáticos. Além disso, deve ser evitado higienizar a genitália com soluções detergentes, o resíduo poderá contaminar a urina coletada e a orientação adequada deve ser a de retrair o prepúcio (homens) ou a de afastar os grandes lábios (mulheres) e desprezar o jato inicial.

A contaminação também pode ocorrer quando a urina é obtida através de cateterismo, em função da passagem do cateter pela uretra anterior. À semelhança da micção espontânea, recomenda-se desprezar o “jato” urinário inicial (10 a 15 mL). Nesta circunstância, contudo, está indicada a antissepsia da genitália, antes da inserção do cateter, com o intuito de reduzir o risco de infecção secundária ao procedimento. Quando obtida por punção suprapúbica a urina é habitualmente estéril, o que significa que, excluídas as possibilidades de contaminação com a microbiota da pele, o crescimento de qualquer número de bactérias pode ser considerado significativo.

A urina é um excelente meio de cultivo para muitas bactérias, particularmente em temperatura adequada. Quando permanece por tempo prolongado em temperatura ambiente, ocorre excessiva multiplicação bacteriana antes da semeadura do material, o que impossibilita a interpretação quantitativa do resultado. A urina, especialmente se obtida a partir do jato médio ou por cateterismo, deve ser rapidamente encaminhada ao laboratório para cultura. Se não for possível encaminhar o material em tempo hábil (em até um *máximo* de 30 minutos), a urina

deverá ser *imediatamente* refrigerada (Baron *et al.*, 2013) a uma temperatura entre 2 e 8°C, por não mais que 12 horas.

O Gram de uma gota de urina não-centrifugada é extremamente útil na avaliação quantitativa inicial do grau de bacteriúria. A análise da bacterioscopia inicia-se pela verificação da qualidade da amostra de urina obtida uma vez que o achado de múltiplas células epiteliais (>3 células/campo, aumento de 100x) e de vários tipos de micro-organismos sugere inadequação da coleta (primeiro jato ou contaminação genital). Em relação a avaliação da bacteriúria, o achado de pelo menos uma célula bacteriana por campo de imersão corresponde, em mais de 95% das vezes, a culturas quantitativas da ordem de 100.000 colônias/mL. Contudo, o Gram pode não detectar bactérias quando a contagem de colônias é igual ou menor que 10.000 colônias /mL, valores que podem significar infecção nos indivíduos sintomáticos [Quadro 3]. De grande importância, através do Gram é possível presumir a etiologia da infecção urinária através da observação das características morfotintoriais da bactéria associada a bacteriúria demonstrada, o que permitirá orientar a terapêutica inicial, fundamental nos casos mais graves.

Quadro 3
Urina: cultura quantitativa

Forma de coleta	Manifestações urinárias	Contagem significativa (UFC/mL)
Jato médio, ambos os sexos	Assintomáticos*	≥ 100.000
Jato médio, sexo masculino	Presentes	≥ 1000
Jato médio, sexo feminino	Presentes e sugestivas de cistite	≥ 100
Cateter para coleta	Presente	> 100
Cateter de demora	Presente	≥ 100.000
Punção suprapúbica	Valorizar qualquer crescimento	
* Bacteriúria assintomática - para o homem é definida pelo achado de uma amostra positiva com contagem significativa e para a mulher pelo achado de duas amostras positivas com contagens significativas para o mesmo micro-organismo.		

Os agentes etiológicos mais comuns de infecção urinária (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*) crescem facilmente nos meios de cultura comumente utilizados pelos laboratórios de rotina. Os resultados da cultura (quantificação de colônias, identificação do agente e antibiograma) estão, em geral, disponíveis em 48 a 72 horas.

- **Trato genital**

O útero, trompas de Falópio, testículos e epidídimo, habitualmente, são isentos de micro-organismos, porém a vagina, a genitália externa e a uretra anterior possuem numerosa microbiota residente.

A doença pélvica inflamatória (DPI) pode ser causada por patógenos primários (principalmente a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Chlamydia trachomatis*) e por patógenos secundários presentes na microbiota vaginal, aeróbicos (cocos gram-positivos) ou anaeróbicos (*Bacteroides fragilis*). A confirmação do diagnóstico de DPI, para evitar a contaminação pela microbiota vaginal, é feita a partir de cultura de material do endométrio coletado sob visualização direta através de cateter. O material, que é coletado por aspiração em seringa, deve ser enviado para a cultura em meios adequados, inclusive para anaeróbios. A confirmação do diagnóstico da tuberculose genital é feita através de cultura, uma vez que o exame direto através do Ziehl-Neelsen pode detectar micobactérias saprófitas da microbiota residente urogenital, morfologicamente indistinguíveis do *Mycobacterium tuberculosis*.

O Gram, em geral, permite o diagnóstico de uretrite e cervicite gonocócica, quando demonstra a presença de diplococos gram-negativos intraleucocitários agrupado em pares. Quando o Gram não demonstra a presença destes micro-organismos intracelulares, o que ocorre mais comumente em mulheres, para excluir a etiologia gonocócica, é necessária realização de

cultura em meio adequado ao crescimento da *Neisseria gonorrhoeae*. É importante destacar que não é possível demonstrar através do Gram, a presença de agentes habituais das uretrites e cervicites não-gonocócicas, como a *Chlamydia trachomatis* e, que a associação etiológica (gonocócica e não-gonocócica) é relativamente frequente (até 30% dos casos de uretrite). Neste contexto, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), são úteis para o diagnóstico etiológico acurado.

O Gram também pode permitir a confirmação do diagnóstico da vaginose por *Gardnerella vaginalis*, uma vez que torna possível a visualização de grande número destas bactérias aderidas às células da mucosa vaginal (células-indício ou *clue cells*).

• **Trato intestinal**

Os intestinos possuem numerosa microbiota residente. As coproculturas têm indicação na investigação de diarreias nas quais se suspeite de etiologia bacteriana, principalmente as passíveis de tratamento antibiótico (como nas causadas por *Shigella* sp). Também são empregadas para determinar a condição de portador assintomático (*Salmonella* sp). As coproculturas devem ser obtidas a partir de amostra fecal fresca e o laboratório deve ser informado da suspeita etiológica, uma vez que algumas bactérias (*Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*) necessitam de meios especiais.

O Gram não é útil na investigação de diarreias, mas o exame direto com azul de metileno para determinar a presença (e o tipo predominante) de leucócitos fecais é um importante método complementar na presunção etiológica da natureza do quadro diarreico.

A *Escherichia coli* é a bactéria aeróbica mais prevalente na microbiota residente habitual das fezes. No entanto, algumas estirpes de *E. coli* podem ser patogênicas e são importantes causas de diarreia (crianças, viajantes) associada ao consumo de alimentos, principalmente a *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), onde está incluída a *E. coli* O157:H7. O simples crescimento da *E. coli* em coprocultura não tem significado clínico, a não ser quando é possível caracterizá-la como patogênica, o que não é feito pela maioria dos laboratórios de rotina.

B. Coleta de material em áreas que não possuem microbiota residente

A princípio, a detecção de bactérias em locais que não possuem microbiota residente (sangue, tecido celular subcutâneo etc.) deve ser sempre considerada como alerta de gravidade clínica, pois a presença de bactéria nestes locais, em geral significa um processo infeccioso grave ou potencialmente grave. Nessas circunstâncias, as culturas e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos são, como regra, essenciais.

A coleta de material deve ser feita obedecendo a técnica asséptica, como o objetivo de evitar contaminação com a microbiota residente e permitir a interpretação correta de um isolamento bacteriano. Bactérias como o *Staphylococcus epidermidis* e difteróides fazem parte da microbiota residente habitual da pele e podem ser contaminantes, mas podem também ser causas de infecções graves em pessoas com próteses e em imunodeficientes. A obediência estrita à técnica asséptica de coleta de material, permite – junto com os dados clínicos e epidemiológicos – a interpretação correta do isolamento em cultura destas bactérias.

O Gram é, em geral, essencial para a avaliação inicial de amostras obtidas de locais sem microbiota residente habitual (estéreis), uma vez que permite a presunção etiológica do agente através da análise de características morfotintoriais. Em razão disto, torna possível o início precoce e racional da terapêutica antibiótica. Além disto, permite ainda uma interpretação mais segura dos resultados de cultura, pela verificação da coerência entre os resultados.

Alguns processos infecciosos, em geral abscessos (cerebrais, pélvicos, tubo-ovarianos hepáticos, peritoniais, subfrênicos etc.), têm a participação importante (cerca de 90%) de

bactérias anaeróbicas. Nestas condições, o material a ser enviado para cultura deve ser coletado por aspiração e o ar presente na seringa deve ser imediatamente eliminado. O material deve ser encaminhado rapidamente ao laboratório e a suspeita de anaeróbios deve ser informada, para que a sementeira ocorra em meios adequados. Alguns laboratórios dispõem de meios de transportes próprios para anaeróbios, o que permite a inoculação antes do encaminhamento. Em qualquer circunstância deve ser evitada a refrigeração destes materiais, pois o oxigênio se difunde mais rapidamente em materiais com temperatura mais baixa.

- **Sistema cardiovascular**

As hemoculturas [Quadro 4] têm uma posição de destaque na investigação etiológica das doenças infecciosas, sendo particularmente úteis na abordagem dos casos graves (*sepses*). Mais recentemente, o advento dos métodos automatizados tornou possível a monitorização contínua do crescimento de micro-organismos, simplificando o processamento das hemoculturas e reduzindo o risco de contaminação que pode ocorrer durante o manuseio.

Nas infecções bacterianas com foco primário extravascular e disseminação hematogênica (abscesso visceral, pielonefrite, pneumonia, entre outros), as bactérias estão presentes no sangue, em geral de modo intermitente e em pequeno número. Em razão disto, o isolamento de bactérias do sangue depende da coleta de várias amostras (duas a três, em geral) com intervalo de minutos a algumas horas, dependendo da condição clínica do paciente. Nas situações de emergência (como no choque séptico), as hemoculturas podem ser coletadas até simultaneamente, desde que em locais diferentes.

Nas infecções bacterianas com foco primário endovascular (endocardite, tromboflebite, aneurisma infectado, *sepsis* associada a cateter), as bactérias estão presentes de forma contínua, o que facilita o isolamento. Contudo, também neste contexto recomenda-se coleta de amostras múltiplas (três a quatro, em geral), o que torna mais simples a discriminação entre patógeno verdadeiro e contaminante eventual, o que é fundamental nos quadros sépticos em pacientes com próteses em que o *S. epidermidis* pode estar envolvido. A coleta de amostras múltiplas também aumenta a probabilidade de isolar micro-organismos de crescimento exigente (grupo HACEK) que podem estar etiológicamente implicados em uma parcela de casos de endocardite.

A prática de obtenção do volume total de sangue em uma única amostra (30 a 60 mL em adultos) no intuito de simplificar (e tornar mais econômico) o hemocultivo deve ser desaconselhada, visto que o isolamento em amostra *única* poderá não permitir uma interpretação segura do papel patogênico do agente isolado, particularmente quando o micro-organismo faz parte da microbiota residente habitual da pele. É bem mais fácil perceber a ocorrência da contaminação quando várias amostras são colhidas e o crescimento se restringe a uma delas e a bactéria isolada não explica o contexto clínico. No entanto, independente do número de amostras, a interpretação fica facilitada quando é possível presumir o agente etiológico em bases clínico-epidemiológicas e o micro-organismo isolado é o mesmo.

O *Staphylococcus epidermidis* (cocos gram-positivos dispostos em cachos, coagulase-negativos), um dos constituintes mais numerosos da microbiota da pele é o contaminante mais comum de hemoculturas. Contudo, a participação desta bactéria em processos patogênicos geralmente se restringe a contextos especiais, como nas infecções associadas a próteses e nas *sepses* que acometem pacientes com imunodeficiências graves. Outros contaminantes reportados com relativa frequência são *Propionibacterium* spp, os difteróides, espécies do gênero *Bacillus* e, menos comumente os *Streptococcus* do grupo *viridans* e *Enterococcus* spp. Por outro lado, o isolamento de bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroidaceae* e *Staphylococcus aureus* geralmente tem significado clínico e devem ser valorizados.

O sangue para hemoculturas deve ser coletado exclusivamente através de punção venosa. Amostras coletadas a partir de acessos venosos estabelecidos (cateterismo, dissecação) são inadequadas em razão do elevado risco de contaminação [Quadro 4]. Quando a coleta de amostras é feita em vigência de antimicrobianos, é recomendável a utilização de meios especiais contendo carvão ativado, resinas de vidro ou substâncias líticas no intuito de minimizar a interferência do medicamento no crescimento bacteriano *in vitro*.

É recomendável obter um volume adequado de sangue para inoculação em meio apropriado, sendo fundamental conhecer preliminarmente as orientações do fabricante para melhorar o rendimento do cultivo. O estabelecimento da relação ideal sangue/meio também leva em consideração a atividade bacteriostática do sangue (conferida pela presença de leucócitos, lisozimas, complemento) que exerce um papel antagônico ao crescimento bacteriano, em contrapartida ao maior rendimento esperado com a utilização de grandes volumes de sangue. Para a maioria dos meios comercialmente disponíveis, a relação sangue/meio recomendada varia de 1/10 a 1/5 (10 a 20%). Uma vez inoculada a amostra de sangue, o frasco de hemocultura deverá ser mantido em temperatura ambiente (20 a 25°C) e, o mais rápido possível, encaminhado ao laboratório para processamento. Se, por limitações técnicas, não for possível o encaminhamento imediato, o frasco deverá permanecer em temperatura ambiente (até 12 horas). Não se refrigera frasco de hemocultura inoculado, visto que a baixa temperatura inibe significativamente o crescimento bacteriano.

Quadro 4

Procedimentos para coleta de hemoculturas

1. Preparar todo o material que será utilizado no procedimento e organizá-lo de forma que seja facilmente alcançável.
2. Higienizar as mãos (lavagem com clorexidina detergente ou fricção com álcool gel).
3. Identificar a veia, preferencialmente na prega ulnar ou dorso da mão (áreas com menor colonização da pele).
4. Colocar as luvas de procedimento, para reduzir o risco de infecção durante o ato da coleta com os agentes infecciosos transmitidos pelo sangue.
5. Fazer a desinfecção da tampa do frasco de hemocultura com álcool 70%.
6. Proceder à limpeza preliminar da pele com solução detergente de clorexidina.
7. Realizar a antisepsia local com solução de clorexidina alcoólica (0,5% e aguardar a secagem por 1 minuto. Aplicar o antisséptico com movimentos circulares (de dentro para fora).
8. Após a antisepsia, não palpar a área da punção. Caso seja necessário, usar luvas estéreis.
9. A venopuntura é geralmente realizada com seringa (de 20 mL em adultos), tomando-se o cuidado de não tocar a agulha, nem a pele limpa.
10. O sangue deve ser injetado rapidamente (em até um minuto) no frasco (ou frascos) de cultura, sem troca de agulha, para evitar acidentes.
11. Descartar seringa e agulha (sem reencapar) em coletor apropriado de paredes rígidas e impermeáveis.

* Repetir todos procedimentos para coleta de nova amostra em acesso venoso diferente.

** Quando utilizadas soluções iodadas para limpeza e antisepsia da pele, retirar o excesso de iodo com álcool para evitar exposição cutânea prolongada e potencial sensibilização.

Em adultos, são utilizados, geralmente, de 10 a 20 mL por amostra coletada (“set”), volume que costuma ser dividido em 2 frascos (5 a 10 mL de sangue por frasco contendo cerca de 40 a 45 mL de meio de cultura), sugerindo-se a utilização de um frasco para aeróbios e o outro para anaeróbios, o último com intuito adicional de aumentar a probabilidade de recuperação de micro-organismos microaerofílicos, inclusive *Streptococcus pneumoniae* (Baron *et al.*, 2013). Contudo, se por limitação técnica eventual o volume total coletado numa determinada amostra for inferior a 10 mL, recomenda-se inocular apenas no frasco para aeróbios.

Em crianças, é possível manter o rendimento final do isolamento bacteriano com a coleta de duas amostras (e não três) e de volumes menores por amostra. O volume total coletado nas duas amostras deve ser de aproximadamente 1% do volume sanguíneo da criança estimado pelo peso corporal (cerca de 70 mL/kg). Desta forma, uma criança com peso corporal de 10 kg, com um volume sanguíneo estimado de 700 mL, colheria duas amostras de 3,5 mL.

Preferencialmente, frascos de hemoculturas pediátricos (contendo até no máximo 20 mL de meio de cultura) deverão ser utilizados, visando preservar a relação sangue/meio ideal.

No intuito de permitir rapidamente a presunção etiológica nas *sepses*, é possível realizar a bacterioscopia pelo Gram do creme leucocitário (*buffy coat*). O material, que é constituído por leucócitos e plaquetas, corresponde a camada intermediária branco-acinzentada que se forma entre o plasma (mais leve na parte superior) e os eritrócitos (mais pesados no fundo), após centrifugação de uma amostra de sangue total. O procedimento habitual consiste na colheita asséptica de uma amostra de sangue (3 mL em adultos) em tubo com EDTA, que então é centrifugada a 1350 rpm durante 5 minutos. De uma forma geral o método é bem menos sensível do que a hemocultura, uma vez que nas bacteremias a concentração de micro-organismos no sangue tende a ser baixa ($<2 \times 10^2$ UFC/mL) e a visualização do agente requer um número mais elevado ($> 4 \times 10^3$ UFC/mL). O rendimento é algo melhor nas *sepses* causadas por bactérias com replicação intracelular, como na *febre tifoide* (*Salmonella typhi*), que constituem o contexto de maior aplicação do Gram do creme leucocitário na rotina clínica. É importante ressaltar que não é adequado solicitar “Gram do sangue”, pois a coloração de uma amostra de sangue total por essa técnica é inadequada em virtude da presença de grande número de hemácias e plaquetas, além do exame ter menor chance de demonstrar o micro-organismo quando comparada ao do creme leucocitário (maior concentração).

• Sistema nervoso central

A *meningite bacteriana aguda* é uma emergência infecciosa. A obtenção e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) é etapa importante para a confirmação do diagnóstico e intervenção terapêutica. O ideal é que, sempre que possível, o LCR seja obtido imediatamente. Contudo, a decisão de realizar ou não a punção lombar para análise do LCR deverá, obrigatoriamente, levar em consideração as contraindicações ao procedimento [Quadro 5], pelo risco de *herniação encefálica e óbito*, e a magnitude do retardo para introdução do antibiótico (Nadel *et al.*, 1998).

Quadro 5

Principais contraindicações para a realização da punção lombar

1. Evidências clínicas de hipertensão intracraniana grave, como ritmo respiratório irregular, bradicardia, hipertensão arterial, coma, sinais neurológicos focais, alterações e assimetrias pupilares, comprometimento de movimentos oculares, convulsões recentes (particularmente, subentrantes), papiledema, Glasgow < 9 (ou queda súbita, >3 pontos), pois implicam maior risco de herniação cerebral.
2. Condições neurológicas concomitantes (AVC, trauma, abscesso), presumidas ou comprovadas por exame de imagem, que indiretamente implicam maior risco de efeito expansivo.
3. Imunossupressão de base ou induzida por droga, pelo risco da presença de lesões expansivas intracranianas decorrentes de infecções oportunistas.
4. Instabilidade hemodinâmica (choque) ou insuficiência respiratória, que podem ser agravados pelo procedimento.
5. Coagulopatia, pelo risco de ocasionar hemorragia subaracnoidea e compressão de raízes nervosas.
6. Presença de infecção de pele ou tecidos adjacentes no local de realização do procedimento, que possam significar risco de meningite supurativa iatrogênica.

Se o risco presumido para a punção lombar é alto ou o tempo para a realização do procedimento é demasiadamente longo, a primeira dose do antibiótico deve ser administrada e a punção lombar deverá ser feita *a posteriori*, caso as condições permitam, visto que mesmo que a cultura seja negativa, ainda será possível realizar o Gram, a pesquisa de antígenos e a PCR. É recomendável ainda, neste contexto de extrema gravidade, obter paralelamente *hemoculturas* (no mínimo duas), para aumentar as chances de isolamento do agente (a bacteremia é comum nas *meningites*) e realização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

O volume de LCR em um indivíduo depende da faixa etária [Quadro 6] e é renovado a cada 6 a 8 horas. Observadas as *contraindicações*, o LCR deve ser coletado (em adulto, se possível, 4

mL) e distribuído em tubos estéreis, para bioquímica (tubo 1), microbiologia (tubo 2), citologia (tubo 3) e testes de diagnóstico molecular (tubo 4). Dependendo dos exames a serem solicitados, pode ser desejável a coleta de um volume maior (10 a 15 mL em adultos), como no caso de suspeita de meningite causada por fungos ou micobactérias. Na *ausência de contraindicações*, até um **máximo** de 10% do volume total estimado de LCR podem ser obtidos para a realização de exames complementares através de punção lombar.

Quadro 6

Estimativa do volume total de LCR e da fração que pode ser retirada de acordo com a faixa etária

Faixa etária	Volume existente (mL)	Volume usual (e máximo) que poderá ser retirado (mL) na punção
Prematuros	10 a 20	0,5 (até 1,0)
Recém-natos	40	1,0 a 2,0 (até 3,0)
Crianças	40 a 90	1,0 a 3,0 (de 4,0 a 9,0)
Adultos	100 a 150	2,0 a 4,0 (de 10,0 a 15,0)

Os tubos devem ser numerados na ordem sequencial da coleta e corretamente rotulados (nome do paciente, tipo de espécime, data e hora da coleta) à *lápiz*, para evitar o borramento da etiqueta. O primeiro tubo não deve ser utilizado para os exames microbiológicos, devido a maior probabilidade de estar contaminado com a microbiota da pele e de conter resíduos de substâncias utilizadas na assepsia da pele.

Os tubos contendo LCR devem ser mantidos em temperatura ambiente e transportados ao laboratório o mais rapidamente possível, para minimizar a ocorrência de lise de leucócitos (redução de 32% após uma hora) e morte bacteriana em função das variações térmicas (Gray e Fedorko, 1992). O resultado do cultivo do LCR não produz resultados imediatos, porém a realização de exames adicionais, como análise do aspecto, contagem de leucócitos, Gram, látex e PCR permite obter informações potencialmente úteis para a condução inicial do caso.

O início da antibioticoterapia nas *meningites bacterianas agudas* não deve ser *retardado*. Quando não for possível a obtenção de LCR antes do início do tratamento, a punção lombar deverá ser feita *a posteriori*, tão logo as condições permitam. Nestas circunstâncias, mesmo que a cultura seja negativa, o LCR permite a realização do Gram, da pesquisa de antígenos e da PCR, métodos significativamente úteis na presunção etiológica.

• Articulações, pleura e pericárdio

As articulações, a pleura e o pericárdio são locais que não possuem microbiota residente. O material deve ser coletado através de seringas e, para evitar a coagulação, com a utilização anticoagulante estéril. Os processos infecciosos destes locais, particularmente os da pleura, também podem envolver a participação de bactérias anaeróbicas, o que implica cuidados adequados para o isolamento destes micro-organismo. O Gram é, como em todos os materiais provenientes de locais sem microbiota residente, essencial para a avaliação inicial de amostras obtidas destes locais.

• Medula óssea

A medula óssea não possui microbiota residente. A obtenção de aspirado ou biópsia de medula óssea pode ser útil na investigação de quadros febris de evolução subaguda, particularmente quando há alteração periférica detectável das células sanguíneas no hemograma. Neste contexto, além de possibilitar o diagnóstico diferencial com as doenças hematológicas malignas, a amostra de medula óssea poderá ser submetida a exames microbiológicos diretos, a técnicas de demonstração histológica e à cultura. A sensibilidade tende a ser elevada na *febre tifoide*, na *tuberculose miliar*, na *histoplasmose disseminada* e no *calazar*.

4. Confirmação etiológica

Nas doenças infecciosas, não raramente, a confirmação (ou exclusão) do diagnóstico presumido constitui uma **emergência médica** e um teste laboratorial adequado deve ser realizado o mais rápido possível para que sejam imediatamente tomadas as medidas terapêuticas específicas mais adequadas. É o que acontece, por exemplo, na suspeita de *malária* e nas *meningoencefalites*. Nestas circunstâncias, os métodos de demonstração direta e rápida da presença do agente (respectivamente Giemsa de amostra de sangue periférico e Gram do líquido cefalorraquidiano) têm importância fundamental na orientação da intervenção preliminar.

Em algumas situações, como nos casos de *sepsis*, não é possível confirmar a etiologia rapidamente. A intervenção terapêutica preliminar, sempre que possível feita após coleta de amostras para diagnóstico microbiológico, deverá ser baseada nos critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais disponíveis, para evitar que um retardo coloque a vida do paciente em risco. As informações dos exames microbiológicos processados serão fundamentais para o ajuste e seguimento terapêutico posterior.

A confirmação ou exclusão do diagnóstico nos casos que tenham evoluído gravemente ou para óbito, mesmo sendo feita *a posteriori*, é fundamental na obtenção de informações que levem a um maior conhecimento clínico da doença. A confirmação etiológica tem ainda grande importância epidemiológica, e deve ser obtida especialmente quando o paciente é oriundo de uma área onde a doença presumida não era antes descrita, pois contribuirá para o planejamento e implementação das medidas de controle cabíveis.

A. Métodos de demonstração do agente etiológico por microscopia

A forma mais simples e rápida de demonstrar a presença de um agente infeccioso é através do exame microscópico do material biológico preparado em lâmina. As diferentes morfologias e propriedades tintoriais dos micro-organismos observadas à microscopia possibilitam frequentemente o reconhecimento preliminar, e por vezes até a identificação definitiva, do agente infeccioso.

Alguns micro-organismos dotados de grande motilidade podem ser visualizados apenas com adição de *solução salina* ao material original, como o *Trichomonas vaginalis* em secreção vaginal. Outros, como o *Paracoccidoides brasiliensis*, tornam-se mais facilmente visíveis em materiais biológicos (escarro, aspirado ganglionar), quando se promove a lise dos demais constituintes da amostra por substâncias químicas, como a *potassa* (KOH).

Adicionalmente, a visualização de um agente infeccioso pode ser bastante facilitada através da utilização de recursos de contraste, sendo particularmente difundidas na rotina microbiológica, as técnicas que utilizam corantes, como o **Gram** (visualização da maioria das bactérias de importância médica), o **Ziehl-Neelsen** (pesquisa de *Mycobacterium* spp, principalmente) e o **Giemsa** (pesquisa de protozoários, como *Plasmodium* spp). No caso de micro-organismos *encapsulados* (fungos ou bactérias) pode ser empregada a técnica de *coloração negativa*, na qual o corante utilizado não impregna o agente infeccioso, mas o material onde ele está. O contraste resultante entre o material (corado) e o micro-organismo (não corado) permite a visualização detalhada da morfologia do agente infeccioso. Um dos métodos de *coloração negativa* mais utilizados é o do **nanquim** (tinta da China) na pesquisa de *Cryptococcus neoformans* em líquido cefalorraquidiano. Quando os microrganismos fixam inadequadamente os corantes convencionais, é possível, o emprego de técnicas diferenciadas sem a utilização de corantes, como a microscopia de campo escuro (pesquisa de *Treponema pallidum*).

• Gram

Em 1884, o médico dinamarquês Hans Christian Gram, desenvolveu uma técnica que permitia a coloração de bactérias, que facilitava enormemente a visualização microscópica permitia

classificá-las em dois grupos, gram-positivas e gram-negativas. O método de Gram representou um grande avanço para a identificação, classificação e estudo das principais bactérias de importância médica. Os custos com investimento e manutenção são consideravelmente baixos diante da eficácia alcançada com os resultados imediatos dos testes. Ainda hoje, com algumas modificações, o Gram é o método laboratorial mais utilizado para a identificação *presuntiva* de agentes bacterianos a partir de materiais clínicos [Quadro 7].

Quadro 7

Gram: características morfológicas das principais bactérias de importância médica

Características morfológicas (Gram)	Bactérias de importância médica	Principais doenças (ocasionadas diretamente ou por produção de toxinas)
Cocos gram-positivos agrupados em cadeias	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Amigdalite, impetigo, erisipela
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Otite, pneumonia; meningite
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Meningite e sepse neonatal
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Infecção urinária, endocardite
Cocos gram-positivos agrupados em cachos	<i>Staphylococcus aureus</i>	Furúnculo, celulite, osteomielite, artrite, pneumonia, endocardite, sepse
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Infecções associadas a próteses e cateteres
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cistite
Bacilos gram-positivos	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria
	<i>Clostridium tetani</i>	Tétano
	<i>Lysteria monocytogenes</i>	Meningite e sepse em neonatos e imunodeficientes
Cocos gram-negativos	<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningite, meningococemia
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Uretrite, cervicite, DPI, gonococemia
Cocobacilos gram -negativos	<i>Haemophilus influenzae B</i>	Meningite, pneumonia, epiglote
Bacilos gram-negativos	Enterobactérias*: • <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp</i> , • <i>Klebsiella spp</i> , <i>Enterobacter spp</i> • <i>Salmonella typhi</i>	• Infecção urinária, sepse abdominal, meningite neonatal, infecções hospitalares • Febre tifoide
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sepse em imunodeficientes Pneumonia associada à prótese ventilatória
	<i>Bacteroides spp</i>	Abscessos (infecções por anaeróbios)

*O termo enterobactérias refere-se aos membros da família *Enterobacteriaceae*, comumente encontrados como parte da microbiota intestinal humana/animal. Possuem em comum quatro atributos maiores: fermentam glicose, reduzem nitrato a nitrito, não produzem citocromo oxidase e quase todos são móveis (exceto *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia*).

A técnica é simples, rápida e tem alta capacidade de resolução. Em linhas gerais, consiste em colocar uma gota (materiais líquidos como o LCR e a urina) ou preparar uma distensão (materiais espessos como pus e escarro) sobre lâmina limpa, deixar secar alguns minutos à temperatura ambiente e proceder a coloração. Todo o procedimento não exige mais que 20 a 30 minutos.

A bacterioscopia pelo Gram permite identificar *presuntivamente* uma bactéria dentro de um contexto clínico, através de suas características morfológicas peculiares. As diferenças tintoriais resultam fundamentalmente das diferenças na composição da parede celular bacteriana, conferindo capacidades distintas de reter o primeiro corante (violeta que confere coloração roxo-azulada aos gram-positivos), ou serem descoradas pelo álcool e a seguir coradas pelo corante de fundo (fucsina ou safranina que confere coloração avermelhada aos gram-negativos).

A correta interpretação do Gram, entretanto, depende de uma análise criteriosa da correspondência entre o micro-organismo compatível com as características morfológicas observadas, o material biológico examinado e o contexto clínico [Quadro 7]. Assim, por exemplo, o mesmo achado de cocos gram-positivos agrupados em cadeias obtidos de materiais biológicos de pacientes em contextos clínicos distintos (LCR de meningite neonatal

e urina de pielonefrite), corresponderam a agentes infecciosos diferentes (respectivamente *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*).

A *sensibilidade* do Gram varia consideravelmente com o inóculo bacteriano presente no espécime. Na investigação de infecção urinária a *sensibilidade* é de 25%, quando estão presentes menos que 1000 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL, e de até 97% quando a quantidade é superior a 100000 UFC/mL. O uso prévio de antimicrobianos, com potencial de reduzir a população bacteriana, resulta frequentemente em diminuição da *sensibilidade* do teste. Nas meningoencefalites por *S. pneumoniae*, por exemplo, a *sensibilidade* do Gram de LCR é de cerca de 90% nos casos não previamente tratados com antibióticos. Nos casos em que o início da antibioticoterapia antecedeu a coleta de LCR, reduz-se para cerca de 60%.

No intuito de propiciar maior rendimento do Gram em líquidos corporais (cefalorraquidiano, pleural, pericárdico, peritonal, sinovial) é recomendável utilizar o *sedimento* do respectivo líquido biológico obtido através de recursos de concentração celular, como a centrifugação (10000 x G durante 10 minutos ou 1000 x G durante 60 minutos). O emprego do Gram em sedimento é particularmente útil no contexto da investigação de quadros infecciosos graves em pessoas que fizeram uso prévio de antimicrobianos.

A especificidade do Gram é elevada quando o material biológico é proveniente de local desprovido de microbiota habitual (sítios estéreis, como o LCR). Contudo, para interpretar os resultados da bacterioscopia pelo Gram de espécimes provenientes de locais (ou obtidos através destes) em que o micro-organismo demonstrado faz parte da microbiota, deve-se atentar para rigorosos critérios de representatividade da amostra e confiabilidade dos achados [Quadro 8].

Quadro 8

Gram: critérios de representatividade de amostras

Amostras	Critério de confiabilidade da amostra (aumento de 100 x)	
Escarro	< 10 células epiteliais	≥ 25 polimorfonucleares
Urina – jato médio	< 3 células epiteliais	-----

À medida que o método de Gram permite avaliar a representatividade da amostra coletada mostra-se de grande utilidade para a decisão da pertinência (ou não) de prosseguir o isolamento em cultivo. É comum que, independente da solicitação médica, o Gram seja utilizado pelo laboratório como método de triagem de “amostras adequadas”. É recomendável que as amostras consideradas inadequadas pela bacterioscopia inicial não sejam semeadas, visto que além de representarem trabalho e gastos desnecessários, ainda poderiam resultar em resultados inteiramente não confiáveis. Nesta circunstância, o médico que solicitou o exame deve ser *imediatamente* informado.

Durante o processamento laboratorial, o método do Gram também tem valor para a identificação inicial *presuntiva* de colônias bacterianas obtidas em meios de cultivo. Os resultados preliminares devem ser informados imediatamente ao médico assistente, uma vez que, quando analisados dentro do contexto clínico, têm grande importância para a tomada de decisões, permitindo por vezes ajustes terapêuticos, mesmo antes que a identificação etiológica completa e o antibiograma estejam disponíveis.

A simplicidade do Gram, entretanto, não deve conduzir à convicção de infalibilidade do método. Podem ocorrer erros em razão da realização *inadequada* da técnica ou relacionados ao *observador*. A exposição prolongada ao calor da chama durante a fixação pode causar distorção bacteriana, dificulta o reconhecimento de características morfológicas e a descoloração excessiva ou uso de antimicrobianos (por alteração da parede celular) podem “transformar” um gram-positivo em gram-negativo. Além disto, a *inexperiência* do observador pode resultar em erros. A iluminação de intensidade inadequada (excessiva ou

insuficiente) ou a abertura incorreta do diafragma do microscópio podem, facilmente, fazer com que gram-negativos sejam visualizados como gram-positivos e vice-versa. Pode ainda ocorrer falha na discriminação de caracteres morfotintoriais e um cocobacilo ser descrito como “coco” ou como “bacilo”, além da possibilidade de confundir grãos ou acúmulo de corantes com bactérias.

• Ziehl-Neelsen

A técnica do Ziehl–Neelsen é utilizada para identificação de bactérias que possuem um elevado teor lipídico em suas paredes celulares, como as espécies do gênero *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* e que, em geral, coram-se de forma insatisfatória pelo Gram (“*imagens fantasmas*”).

Na técnica de Ziehl-Neelsen, a carboxifucsina (cor avermelhada) é o corante primário. O calor facilita a penetração deste corante pela parede celular bacteriana. Na etapa seguinte, procede-se a descoloração com a solução álcool-ácida e finaliza-se utilizando o azul de metileno como contrastante. As bactérias que resistem à descoloração álcool-ácida (em razão disto, conhecidas como *álcool-ácido resistentes*) preservam a coloração vermelha, contrastando com o azul dos outros componentes da amostra analisada.

O Ziehl-Neelsen pode ser empregado com sucesso em diversos tipos de amostras biológicas (escarro, LCR, líquido pleural, lavado gástrico etc.). Entretanto, não é útil na confirmação do diagnóstico da *tuberculose genital*, uma vez que não permite a diferenciação morfotintorial entre o *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias saprófitas presentes no microbiota residente.

Em amostras teciduais (fragmentos obtidos por biópsia) é preferível a utilização da técnica de Kinyoun, que é uma modificação do Ziehl-Neelsen. No Kinyoun, não se utiliza o calor (que pode promover distorções histológicas) e, alternativamente, emprega-se uma solução mais concentrada de carboxifucsina, daí a denominação de “Ziehl-Neelsen a frio”. Com pequenas alterações na técnica original (“Ziehl-Neelsen modificado”) é ainda possível demonstrar micro-organismos como *Cryptosporidium* spp em amostras fecais.

Em função do grande número de casos de tuberculose pulmonar em todo mundo, a técnica é amplamente utilizada para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* no escarro. A capacidade de detecção depende do inóculo presente na amostra avaliada, que geralmente é positiva quando presentes >5000 bacilos/mL. Nenhuma amostra deverá ser considerada negativa sem que, no mínimo, 300 campos no aumento de 1000x (imersão) tenham sido cuidadosamente avaliados. Adicionalmente, para considerar como não significativo o risco de um indivíduo com sintomas respiratórios ser um transmissor potencial (bacilífero) é recomendável que sejam coletadas três amostras de escarro espontâneo, se possível matinais em dias consecutivos ou uma amostra de escarro induzido. A cultura, mais sensível, será essencial, para a exclusão ou confirmação posterior do diagnóstico e permitirá, quando positiva a realização do TSA.

• Giemsa

Os corantes derivados do Romanowsky (1890), dos quais o Giemsa é um dos mais utilizados, são amplamente empregados na pesquisa de agentes infecciosos, principalmente nas doenças causadas por protozoários (*malária*, *doença de Chagas*, *leishmanioses* etc.). A situação clínica mais comum de utilização do Giemsa é a investigação de pessoas com suspeita de *malária*, em razão do significativo número de casos da doença no Brasil (334.709 em 2010, segundo dados *preliminares* do Ministério da Saúde).

A confirmação (ou a exclusão) laboratorial do diagnóstico de *malária* deve feita por um microscopista experiente, através do exame cuidadoso, de lâminas corretamente preparadas de sangue periférico e adequadamente coradas pelo Giemsa (ou pelo May-Grünwald-Giemsa). A cromatina dos parasitas fica corada em púrpura e o citoplasma em azul. A distensão de sangue

periférico permite a detecção e a identificação da espécie infectante com relativa facilidade. A gota espessa corada pelo Giemsa, extensamente utilizada em campo, torna possível o exame mais rápido de um volume 3 a 5 vezes maior de sangue, o que permite uma sensibilidade quanto à detecção de espécies de *Plasmodium* maior que a distensão. O intervalo de tempo entre a coleta de sangue e a observação ao microscópio é de cerca de 20 minutos para a distensão e de 1 hora e 20 minutos para a gota espessa.

Em pacientes sintomáticos *não-ímmunes*, em geral, a confirmação do diagnóstico pode ser feita sem dificuldades. Nos *semi-ímmunes*, a detecção de parasitas, em geral existentes em pequeno número, pode tornar necessário um demorado exame da lâmina para que se possa considerá-la como "negativa".

A interpretação do Giemsa, não pode - como em qualquer tipo de exame laboratorial - ser destituída de crítica. Como em qualquer outro método laboratorial, podem ocorrer erros em razão da realização *inadequada* da técnica ou relacionados ao *observador*. Durante a realização da técnica, além do *pH*, que é crítico (entre 6,8 e 7,2), diversos outros fatores podem influenciar a qualidade da coloração (e, portanto, os resultados), como a qualidade da água e do metanol, a limpeza da lâmina utilizada e o tempo de coloração.

A pesquisa de *Plasmodium* spp, quando negativa, não afasta o diagnóstico de *malária* e novas lâminas devem ser repetidas com intervalo de seis horas ou menores, ditados pela gravidade do quadro. Nestas circunstâncias, é prudente que o paciente, quando *não-ímmune*, fique sob observação, porque a evolução para formas graves pode ocorrer em poucas horas.

Em casos de *malária* grave, um microscopista pouco experiente poderá confundir esquizontes de *P. falciparum* com o *P. vivax*. Ainda que diante desse resultado, o médico não poderá cometer o mesmo equívoco, uma vez que *malária* grave deve ser sempre considerada e *tratada* como sendo causada pelo *P. falciparum* até que seja *provado* o contrário,

B. Isolamento em cultivo

O isolamento primário dos agentes infecciosos, particularmente das bactérias e dos fungos, é comumente realizado em condições ótimas de *pH*, temperatura, condições atmosféricas, em meios de cultivo adequados ao micro-organismo em questão e por vezes enriquecidos (com sangue, soro, líquido ascítico). Do ponto de vista clínico, a grande vantagem da cultura sobre os outros métodos de confirmação diagnóstica é tornar possível a determinação subsequente da susceptibilidade do micro-organismo aos antimicrobianos.

Para a maioria das bactérias de importância médica, asseguradas às condições adequadas de cultivo, o crescimento *in vitro* é geralmente detectável em 18 a 24 horas. Para considerar uma cultura como negativa, porém, é prudente aguardar alguns dias (de 2 a 7 dias), dependendo da amostra processada e do agente infeccioso presumido. Para micro-organismos de crescimento lento, como as micobactérias e os fungos, podem ser necessárias semanas (de 2 a 8) para observação do crescimento e as culturas não devem ser liberadas como negativas sem que se cumpra o período de observação necessário.

A identificação é, inicialmente, feita pelas características das colônias (aspecto, tamanho, margens, coloração, odor etc.) e, por vezes, pela capacidade de produzir alterações visíveis no meio de cultivo (hemólise). A bacterioscopia pelo Gram de culturas jovens, à semelhança de espécimes clínicos, permite *presumir* qual o agente em crescimento. Para complementar e tornar mais precisa a identificação da bactéria são empregados testes bioquímicos e imunológicos e, eventualmente, moleculares.

Nos últimos anos, métodos capazes de acelerar a identificação de micro-organismos estão sendo progressivamente disponibilizados. Recentemente, a espectrometria de massa emergiu como tecnologia promissora para identificação de bactérias e fungos. A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time Of Flight* e consiste em uma técnica de espectrofotometria que detecta moléculas de massa maior, como as proteínas

ribossomais. O teste consiste num sistema no qual o material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em placa com uma matriz polimérica. A placa é irradiada com laser que vaporiza a amostra e ocorre ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector. De acordo com a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente e um gráfico específico é produzido. As identificações são realizadas ao comparar o espectro de massa do analito com espectros de referência de banco de dados computadorizada. Essa técnica permite diagnósticos microbiológicos complexos rapidamente (minutos), como, por exemplo, a especiação correta dos estafilococos coagulase negativos ou a definição dos vários sorovariantes da *Salmonella* entérica.

C. Métodos de demonstração da resposta imunológica

Nas doenças infecciosas, não raramente, a confirmação (ou exclusão) do diagnóstico presumido pode ser feita através da demonstração da resposta de defesa específica (resposta imune ou imunológica) do hospedeiro resultante da presença do *agente infeccioso*. A forma mais comum de avaliar laboratorialmente a resposta imune visando diagnóstico é através da análise da produção de anticorpos induzida pelo *agente infeccioso*. A pesquisa de anticorpos séricos (“sorologia”) fornece um marcador indireto de infecção recente ou antiga.

Diversas técnicas laboratoriais como a de aglutinação, de fixação de complemento, de imunodifusão, de imunofluorescência, de ensaio imunoenzimático (ELISA ou EIA), de ensaio imunoenzimático de micropartículas (MEIA), de quimioluminescência, de eletroquimioluminescência (ECLIA) podem ser utilizadas no diagnóstico das doenças infecciosas para a detecção de anticorpos [Quadro 9]. As mais utilizadas em laboratórios clínicos, em decorrência da simplicidade técnica e custo proporcionalmente menor, são a ELISA, o MEIA e a quimioluminescência.

Quadro 9

Sorologias frequentemente utilizadas na investigação de síndrome de mononucleose em adolescentes

Doença ou condição	Exames para detecção de anticorpos
Mononucleose infecciosa (Epstein-Barr)	Pesquisa de anticorpos heterofílicos (ou heterófilos) pelo Monoteste ou Monospot Pesquisa de IgM anticapsídeo por imunoensaio enzimático Pesquisa de IgG anticapsídeo por imunoensaio enzimático (amostras pareadas)
Citomegalovirose	Pesquisa de IgM por imunoensaio enzimático Pesquisa de IgG por imunoensaio enzimático (amostras pareadas)
Toxoplasmose	Pesquisa de IgM por imunofluorescência ou quimioluminescência Pesquisa de IgG por imunofluorescência ou quimioluminescência (amostras pareadas)
Sífilis	VDRL ou RPR para pesquisa de anticorpos não-treponêmicos (inespecíficos) FTA-ABs para pesquisa de anticorpos treponêmicos (IgM e IgG)
Infecção primária pelo HIV	Pesquisa de Anticorpos HIV 1 e 2 por imunoensaio enzimático*

*Importante nesta fase: detecção de HIV-RNA por técnica molecular (PCR).

O sinal biológico comumente pesquisado é um anticorpo da classe IgM ou IgG, direcionado a um antígeno expresso na superfície do *agente infeccioso*. A sorologia é particularmente útil no diagnóstico da maioria das doenças causadas por vírus e por vários protozoários, para os quais o isolamento do *agente infeccioso* em cultivo pode ser bastante trabalhoso e complexo.

Em resposta a um agente infeccioso, o primeiro anticorpo a ser produzido na infecção primária é da classe IgM. Os anticorpos IgM ficam presentes por um curto período de tempo, usualmente desaparecendo de três a seis meses após a infecção. Os anticorpos da classe IgG, são produzidos em sequência, alcançam um pico, decaem parcialmente e geralmente persistem indefinidamente. Portanto, a presença de IgM é geralmente indicativa de infecção aguda, e a presença isolada de IgG, de infecção antiga.

Os testes sorológicos são habitualmente utilizados com dois objetivos diferentes, o de avaliar imunidade (ou susceptibilidade) para um determinado agente e o de investigar a etiologia de um processo infeccioso agudo. No primeiro contexto, geralmente utiliza-se uma amostra de soro para uma determinação qualitativa da presença de nível de anticorpo protetor (IgG). Essa informação pode ser útil para comprovar imunidade prévia para um determinado agente que pode ter sido conferida pela doença natural ou por vacinação específica.

No contexto da investigação etiológica, a demonstração da presença de anticorpos da classe IgM contra um agente é habitualmente utilizada como evidência de infecção recente. Nos quadros infecciosos agudos, o esperado é que os anticorpos da classe IgM já estejam positivos após o quinto dia de sintoma. Alternativamente, são empregadas técnicas quantitativas para avaliar se está ocorrendo aumento significativo nos níveis de anticorpos séricos (IgG) entre amostras colhidas em momentos diferentes (amostras pareadas com intervalo de 10 a 14 dias), correspondentes a fase aguda e convalescente e que devem (ideal) ser testadas simultaneamente. A demonstração de aumento de título de anticorpos (IgG) igual ou superior a quatro vezes entre as amostras (soroconversão) é uma evidência precisa de infecção recente. A soroconversão também é demonstrada quando a amostra aguda é não reativa e se detectam anticorpos (em qualquer título) na amostra convalescente. Títulos estáveis de IgG entre as amostras ou aumentos inferiores a quatro vezes são indicativos de infecção antiga.

O aprimoramento das técnicas imunossorológicas tornou possível detectar a presença de IgM por um período de tempo mais prolongado após a infecção inicial. Níveis baixos ou residuais de IgM podem persistir por até 24 meses, o que dificulta a interpretação do momento exato da infecção, particularmente quando também se detecta a presença de IgG. Além disto, ainda que infreqüentemente, os anticorpos IgM podem ser detectados na reinfeção ou reativação de processos infecciosos.

Recentemente, um método de ensaio imunoenzimático com base na capacidade de ligação dos anticorpos IgG foi desenvolvido para diferenciar infecção recente de infecção antiga com presença de IgM residual. Tal capacidade de ligação, denominada avidéz, é diretamente proporcional ao tempo de infecção. Em quadros infecciosos com até três meses de evolução, a IgG apresenta uma baixa avidéz, enquanto que em infecções com mais de três meses, os anticorpos apresentam uma alta avidéz. O teste de avidéz tem pouca aplicação para o diagnóstico dos quadros infecciosos agudos em geral, não se justificando seu emprego complementar quando o diagnóstico já foi confirmado pela presença de IgM e/ou soroconversão de IgG. A maior utilidade clínica do teste de avidéz é no diagnóstico de infecções gestacionais em mulheres oligo ou assintomáticas. Particularmente na suspeita de toxoplasmose aguda durante a gestação, a determinação mais precisa do momento de infecção é fundamental para definir a necessidade de tratar a gestante no intuito de evitar dano fetal.

A necessidade de diagnóstico rápido, particularmente nas meningoencefalites, estimulou o desenvolvimento de técnicas imunológicas para a detecção dos patógenos habituais, como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. As técnicas mais simples e amplamente utilizadas são a coaglutinação e a aglutinação pelo látex.

D. Pesquisa direta de antígenos por técnicas imunológicas

Os métodos de detecção antigênica baseiam-se, em sua maioria, na reação de anticorpos específicos com o antígeno alvo em amostras clínicas. A relativa simplicidade dos métodos e a rapidez na obtenção de resultados serviram de incentivo para o desenvolvimento e disponibilização progressiva de diversas técnicas (aglutinação pelo látex, contraímunoeletroforese, imunoensaio etc.) para detecção de antígenos de bactérias, fungos, vírus e protozoários [Quadro 10]. Contudo, o principal fator limitante ainda é a falta de padronização destas técnicas para diferentes fabricantes e laboratórios.

Quadro 10**Uso clínico de pesquisa de antígenos específicos por técnicas imunológicas**

Doença ou condição	Material	Exame para detecção de antígenos
Enteroprotosooses	Fezes	Pesquisa de <i>E. histolytica</i> (amebíase), <i>G. lamblia</i> (giardíase) e <i>C. parvum</i> (criptosporidiose) por imunoensaio
Faringite estreptocócica	Swab de orofaringe	Pesquisa de antígeno específico para <i>S. pyogenes</i> por látex ou imunoensaio
Gastrite causada por <i>Helicobacter pylori</i>	Fezes	Pesquisa de antígeno específico para <i>H. pylori</i> por imunoensaio
Hepatite B	Soro	Pesquisa de HBsAg (antígeno de superfície) e de HBeAg (marcador de replicação ativa) por imunoensaio.
Meningites bacterianas	LCR	Pesquisa de <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> e <i>S. agalactiae</i> por látex
Meningite criptocócica	LCR e soro	Pesquisa de <i>Cryptococcus neoformans</i> por látex
Pneumonia por <i>Legionella</i>	Urina	Pesquisa de <i>Legionella pneumophila</i> (sorotipo 1) por imunoensaio.
Pneumonia pneumocócica	Urina	Pesquisa de <i>S. pneumoniae</i> por imunocromatografia
Produção de toxinas	Fezes	Pesquisa de toxina do <i>Clostridium difficile</i> (colite pseudomembranosa) e de toxina Shiga da <i>E. coli</i> por imunoensaio
Víroses respiratórias	Secreção nasofaríngea	Pesquisa de influenza A e B, parainfluenza, adenovírus e VSR* por imunoensaio.

* Vírus sincicial respiratório.

A utilização destas técnicas pode parecer bastante atraente nos casos de bacterioscopia negativa e de particular interesse na doença meningocócica, uma vez que possibilitaria identificar o sorogrupo envolvido, facilitando a definição de estratégia profilática pertinente. Contudo, a sensibilidade encontrada é extremamente variável, e negativamente influenciada pelo uso prévio de antimicrobianos (Greenlee, 1990), o que limita a aplicabilidade de resultados não-reativos na orientação da terapêutica inicial das meningites, ou seja na decisão de introduzir ou não antimicrobiano. A sensibilidade varia de 20 a 100% para o *S. pneumoniae*, de 60% a 100% para *H. influenzae* e de 17% a 74% para *N. meningitidis* (Greenlee, 1990; Gray e Fedorko, 1992) e não é uniforme entre os sorogrupos, sendo mais baixa para o sorogrupo B que para os sorogrupos A, C, Y e W (McGraw e Bruckner, 1984). É ainda relevante destacar que a maioria dos kits disponíveis no comércio nem sempre permite discriminar todos os sorogrupos e que é possível a ocorrência de reações cruzadas. Estas limitações, não sem razão, estão conduzindo ao progressivo abandono das técnicas imunossorológicas na abordagem de casos com suspeita de doença meningocócica e meningoencefalites bacterianas. Melhores resultados, no entanto, da aglutinação pelo látex podem ser obtidos para diagnóstico da meningite causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, tanto em amostras de LCR quanto de soro.

E. Caracterização molecular

O notável avanço da engenharia genética nos últimos 15 anos tem possibilitado o desenvolvimento de técnicas em microbiologia com finalidades diagnóstica e epidemiológica. A tecnologia de ácidos nucleicos inclui sistemas de amplificação de DNA e RNA, sistemas de hibridização e de sequenciamento de DNA. É possível através de técnicas como a PCR e a NASBA (do inglês, *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) identificar "sinais" da presença de agente infeccioso em materiais biológicos, que independem de sua viabilidade, o que pode resultar em maior capacidade de detecção do que os métodos convencionais.

As técnicas moleculares estão se tornando menos complexas e os custos mais reduzidos, o que facilita a incorporação progressiva de muitos destes recursos na rotina dos laboratórios clínicos [Quadro 11]. É importante ressaltar, no entanto, que estas técnicas não podem ser consideradas como substitutas do cultivo, uma vez que é geralmente através do isolamento do agente que se determina a susceptibilidade aos antimicrobianos. A PCR está disponível para detecção de vários micro-organismos e, de forma mais limitada, para detecção da presença de genes de resistência aos antimicrobianos.

Quadro 11**Uso clínico da pesquisa de ácidos nucleicos para diagnóstico em doenças infecciosas**

Doença ou condição	Material	Exame
Chikungunya	Soro	RT-PCR para Chikungunya
Ebola	Sangue total (EDTA)	RT-PCR para Ebola (carga viral)
Gripe	Secreção nasofaríngea	PCR para Influenza A e B; Parainfluenza: VSR* ; Coronavírus.
Infecção primária pelo HIV e seguimento	Soro	PCR para HIV-RNA (carga viral) NASBA para HIV-RNA (carga viral)
Infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i> (uretrite, colpíte, DPI)	Raspado uretral ou do colo uterino	PCR para <i>C. trachomatis</i>
Infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (uretrite, colpíte, DPI)	Raspado uretral ou do colo uterino	PCR para <i>N. gonorrhoeae</i>
Hepatite B	Soro	PCR para hepatite B-DNA (carga viral)
Hepatite C	Soro	PCR para hepatite C-RNA (carga viral)
Meningococemia e meningites bacterianas	Soro e LCR	PCR para <i>Neisseria meningitidis</i> (B, C,...) PCR para <i>Streptococcus pneumoniae</i> PCR para <i>Haemophilus influenzae</i>
Meningite por enterovírus	LCR	PCR para enterovírus
Meningite e encefalite herpética	LCR	PCR para herpes simples (1 e 2) no LCR
Pneumonia por <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Escarro	PCR para <i>Chlamydia pneumoniae</i>
Pneumonia por <i>Chlamydia psittaci</i>	Escarro	PCR para <i>Chlamydia psittaci</i>
Pneumonia por <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Escarro	PCR para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Toxoplasmose congênita	Líquido amniótico	PCR para <i>Toxoplasma gondii</i>
Tuberculose (pulmonar, meníngea)	Escarro, LCR	PCR para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Zika	Soro e urina	PCR para Zika

* Vírus sincicial respiratório.

Os métodos de identificação molecular, indiscutivelmente, têm um enorme campo de aplicação em estudos epidemiológicos. Através da aplicação de PCR associada à análise eletroforética de vários subcomponentes moleculares (proteínas, enzimas metabólicas, DNA cromossomal, DNA plasmidial), é possível definir com maior precisão, quando comparados às técnicas clássicas (biotipagem, sorotipagem, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos), a distância genética entre cepas bacterianas de uma mesma espécie. Desta forma, é possível identificar clones, ou seja, bactérias que descendem de um único ancestral e mapear a disseminação de um determinado clone por áreas geográficas distintas.

5. Métodos de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

O conceito clínico de resistência de uma bactéria a um agente antimicrobiano deriva da observação da resposta à terapêutica. No entanto, a comprovação e a determinação quantitativa da resistência são realizadas *in vitro*. Deste modo, um micro-organismo é considerado *sensível* ou *resistente* a uma determinada droga em função de sua capacidade de desenvolver-se *in vitro*, em presença de concentração habitualmente obtida pela droga *in vivo*, na terapêutica das infecções.

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) ou antibiograma permitem determinar *in vitro* a susceptibilidade de micro-organismos às drogas, tornando possível o seu emprego clínico com razoável grau de certeza quanto à resposta terapêutica. São utilizados dois métodos para a realização do TSA, o de *difusão* e o de *diluição*. O método de *difusão em*

ágar, mais simples e de menor custo, é ainda amplamente utilizado. O método de diluição é mais preciso, porém de custo mais elevado e de realização mais complexa. É utilizado em alguns laboratórios clínicos de maior porte para exames de rotina e em laboratórios de referência para monitorização de resistência bacteriana.

A confiabilidade dos TSA depende de fatores que antecedem a sua realização, como a escolha adequada do material representativo da infecção, os cuidados com a coleta e com o transporte das amostras. Depende ainda de variáveis inerentes à realização do teste, como composição do meio de cultura, densidade do inóculo, tempo de incubação, concentração dos antibióticos utilizados etc. Em razão disto, é fundamental que os laboratórios observem a padronização internacional, periodicamente atualizada por organizações como o *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)** e o *European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS)*.

A seleção das drogas a serem empregados nos TSA é determinada pela sua utilidade na terapêutica das infecções causadas pelo agente a ser testado. É norma a seleção de um antimicrobiano que seja representativo de um grupo com mesmo mecanismo de ação e toxicidade, dando-se preferência àqueles que sejam menos deterioráveis com a estocagem. Deve ser levado ainda em consideração o sítio de infecção, ou seja, o local onde a droga deverá atuar.

É admissível, no entanto, que se teste uma droga que não necessariamente será empregada na terapêutica, mas que possa ser útil, na medida em que resulte em possibilidade de avaliação mais confiável da resistência a outro antimicrobiano utilizável no tratamento. Adicionalmente, a inclusão de antimicrobianos não implicados como alternativa terapêutica poderá ser desejável e necessária como complemento da identificação bacteriana, e também na vigilância do aparecimento e disseminação de resistência.

Na avaliação da sensibilidade do *S. pneumoniae* à penicilina, o emprego de discos contendo a própria penicilina é, independente da concentração utilizada, imprecisa. Resultados mais confiáveis podem ser obtidos com o emprego do disco de oxacilina. A simplicidade da execução da técnica com o disco de oxacilina, que deve conter 1,0 µg, a torna desejável como método de triagem. A amostra é considerada como presumivelmente sensível à penicilina quando a zona de inibição de crescimento for igual ou maior que 20 mm e presumivelmente resistente quando menor que 19 mm. A técnica, contudo, não permite a discriminação entre resistência intermediária ou absoluta, o que torna desejável, particularmente na terapêutica das meningoencefalites, complementar a avaliação da susceptibilidade com um método mais preciso (determinação da CIM - Concentração Inibitória Mínima - por método dilucional ou pelo *Etest*[®]).

A. Difusão em ágar

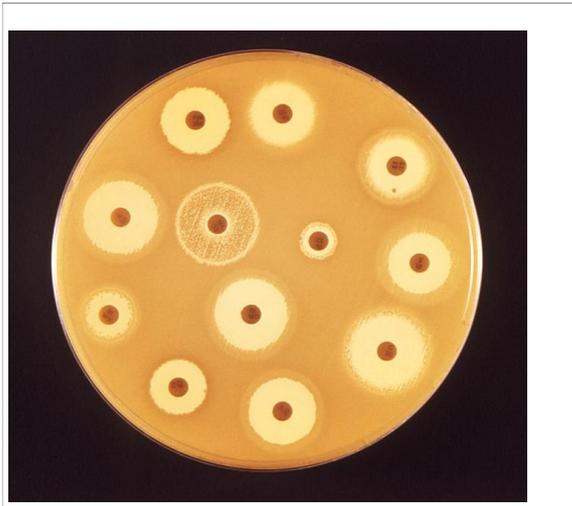
A técnica de Kirby-Bauer [Figura 1] baseia-se na difusão de antimicrobiano contido em disco de papel de filtro aplicado sobre ágar previamente semeado com um inóculo padronizado do micro-organismo a ser testado. À medida que a distância do disco aumenta, a concentração do antimicrobiano difundido diminui logaritmicamente, até o limite (zona ou halo de inibição) em que é possível o crescimento da bactéria inoculada e em multiplicação no ágar, o que determina a Concentração Inibitória Mínima – CIM para a droga testada. A CIM estabelecida pelo limite do halo não é quantificada diretamente em µg/mL. Para isto, o diâmetro do halo de inibição é medido e comparado com tabelas previamente estabelecidas, o que permite verificar se o valor obtido corresponde a uma CIM dentro dos padrões em que se considera o antibiótico como eficaz para o tratamento de infecções causadas pelo micro-organismo testado.

*Anteriormente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*

O teste com o disco é realizado em ágar de Mueller-Hinton, para a maioria das bactérias de importância médica. Contudo, para as bactérias de crescimento exigente, recomenda-se enriquecimento do meio com outros nutrientes. Para o *S. pneumoniae*, por exemplo, o ágar de Mueller-Hinton deve ser suplementado com sangue desfibrinado de carneiro a 5%. O inóculo bacteriano deve ser preparado por suspensão direta em salina de colônias obtidas de cultivo em ágar sangue, incubado por 18 a 24 horas, ajustando-se para a turbidez padrão de 0,5 McFarland. A leitura dos resultados é feita após incubação a 35°C por 20 a 24 horas.

Figura 1

Difusão em ágar: técnica de Kirby-Bauer



Fonte: Public Health Image Library - CDC, 2013.

É possível definir no teste de difusão em ágar, através da comparação do diâmetro da zona de inibição com as tabelas de referência, três diferentes categorias de resposta de um microrganismo a determinado antimicrobiano, “susceptível” (ou “sensível”), “intermediária” e “resistente”. O estabelecimento destas categorias baseia-se na comparação do diâmetro da zona de inibição observada no TSA com tabelas padrão. Naturalmente na seleção do antimicrobiano, deve ser levada em consideração a farmacocinética das drogas, uma vez que as concentrações obtidas nas doses utilizadas clinicamente podem, por exemplo, ser adequadas para o trato urinário e inadequadas para o sistema nervoso central.

B. Métodos dilucionais

Os métodos dilucionais para aferição da susceptibilidade aos antimicrobianos são quantitativos, sendo utilizados para a determinação da menor concentração do antimicrobiano (expressa em $\mu\text{g/mL}$) necessária para a inibição do crescimento bacteriano (CIM). Podem ser realizados tanto em meio líquido como em ágar, empregando-se diluições seriadas do antimicrobiano. A utilização do ágar, por permitir a visualização de características de crescimento em superfície, torna mais fácil a detecção de contaminação. O emprego do meio líquido, que é mais difundido, possibilita através de subcultivo, determinar a CBM, definida como a menor concentração do antimicrobiano que é letal para pelo menos 99,9% do inóculo original.

Existem dois métodos de diluição em meio líquido: macro e microdiluição. A distinção básica consiste no volume de meio de cultivo, que é igual ou superior a 1,0 mL na macro e de 0,05 a 0,10 mL na microdiluição. A disponibilidade no comércio de painéis de antimicrobianos, liofilizados ou congelados, representa uma simplificação da técnica de microdiluição, por permitir a testagem simultânea de múltiplos antimicrobianos.

A CIM é a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo nos tubos ou nas unidades das placas de microdiluição. Em geral, a categoria sensível é definida por CIM igual ou menor a 1/4 da concentração sérica máxima da

droga alcançada em doses terapêuticas. A categoria intermediária inclui amostras com CIM que se aproxima da concentração obtida no sangue e tecidos corporais para as quais a resposta poderá não ser tão adequada quanto para os susceptíveis. A categoria resistente inclui microrganismos que não são inibidos com as concentrações sistêmicas da droga, obtidas nos esquemas terapêuticos usuais.

Vários sistemas foram desenvolvidos que oferecem diferentes níveis de automatização para agilizar a identificação do crescimento de micro-organismos e a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos. Os sistemas automatizados baseiam-se, em geral, em medições fluorimétricas ou turbidimétricas para detecção do crescimento bacteriano em meio líquido (microdiluição) e utilizam com frequência painéis padronizados de antimicrobianos disponíveis no comércio. A combinação de incubação rápida com leitura automatizada possibilita resultados em poucas horas [Quadros 12x e 13x].

Quadro 12x

Identificação e antibiograma automatizados: bactéria gram negativa.

TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS:		
Identificação e antibiograma (MIC) automatizados		
Material clínico: Urina (segundo jato)		
Germe isolado: <i>Escherichia coli</i>		
Antibiótico		MIC (mcg/mL)
Amicacina:	Sensível	<=8
Amoxicilina/Ac Clavulânico:	Sensível	<=8/4
Ampicilina:	Resistente	>=32
Aztreonam:	Sensível	<=1
Cefalotina:	Sensível	<=8
Cefepime:	Sensível	<=1
Cefotaxima:	Sensível	<=1
Ceftazidima:	Sensível	<=1
Cefuroxima:	Sensível	<=4
Ciprofloxacina:	Sensível	<=0.5
Ertapenem	Sensível	<=0.5
Fosfomicina:	Sensível	<=32
Gentamicina:	Sensível	<=2
Imipenem:	Sensível	<=1
Levofloxacina:	Sensível	<=1
Meropenem:	Sensível	<=1
Nitrofurantoina:	Sensível	<=32
Norfloxacina:	Sensível	<=0.5
Piperacilina/Tazobactam:	Sensível	<=8
Sulfa/Trimetoprim:	Sensível	<=2/38
Tetraciclina:	Sensível	<=4
Tigeciclina:	Sensível	<=1

Quadro 13x

Identificação e antibiograma automatizados: bactéria gram positiva

TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS		
Identificação e antibiograma (MIC) automatizados		
Material clínico: Pus de abscesso		
Germe isolado: <i>Staphylococcus aureus</i>		
Antibiótico		MIC (mcg/mL)
Ampicilina-sulbactam	Sensível	≤ 2
Cefalotina	Sensível	≤ 2
Ciprofloxacina	Sensível	≤ 0.5
Clindamicina	Sensível	≤ 0.5
Eritromicina	Sensível	≤ 0.5
Gentamicina	Sensível	≤ 2
Linezolida	Sensível	≤ 0.5
Moxifloxacina	Sensível	≤ 1
Oxacilina	Sensível	= 0.5
Penicilina G	Resistente	≥ 16
Sulfametoxazol/trimetoprim	Sensível	≤ 0.5/1.0
Tetraciclina	Resistente	≥ 8
Vancomicina	Sensível	= 1

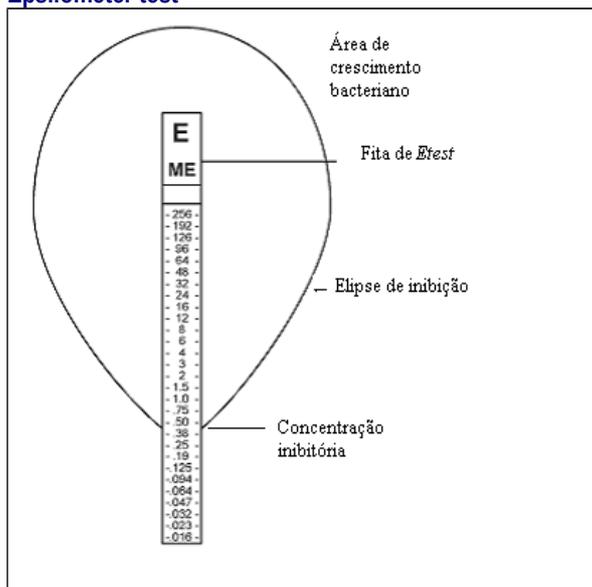
No processamento de hemoculturas, a metodologia amplamente utilizada é a de monitoramento contínuo da amostra por sistema automatizado (*Bactec 9240®* da *Beckton Dickinson*; *BacT/ALERT®*, da *Biomerieux*). O sangue é coletado em frasco apropriado e colocado em um equipamento automatizado que irá monitorar a amostra continuamente a cada 10 minutos durante 24 horas por dia, durante 5 dias. A detecção das hemoculturas positivas é dada a partir do metabolismo microbiano no interior do frasco. A principal vantagem deste método é o monitoramento ininterrupto das amostras, permitindo a obtenção de resultados positivos em até 8 horas após a coleta (dependendo do microrganismo) e a maior sensibilidade em comparação a metodologia manual, que necessita de repiques cegos sucessivos durante 7 dias em meios específicos para se tentar o isolamento de microrganismos que nem sempre são obtidos nos meios convencionais. Nos frascos de hemoculturas automatizadas são utilizados meios de cultura específicos que aumentam a sensibilidade do método, os quais possuem também resinas que inativam os antibióticos que por ventura estejam sendo veiculados no paciente no momento da coleta.

Os métodos automatizados são bastante úteis para a maioria das enterobactérias e para outras bactérias de crescimento rápido, como o *Staphylococcus aureus*. Contudo, apresentam limitações no caso de bactérias com exigências para crescimento (meios enriquecidos, diferentes atmosferas de incubação etc.), como o *Streptococcus pneumoniae*, a *Neisseria meningitidis*, o *Haemophilus influenzae* e os anaeróbios. Além disto, a utilização de painéis padronizados de antimicrobianos, de certa forma, diminui a flexibilidade, por vezes desejável, da escolha do antimicrobiano a ser testado.

C. Teste E

O *Etest®* (*Epsilometer test* - AB BIODISK®) de uso mais recente representa uma interessante combinação da simplicidade do método da difusão em disco com a maior acurácia na avaliação da CIM dos métodos dilucionais convencionais. O *Etest®* é comercializado sob a forma de uma fita plástica fina, inerte e não porosa, com 5 mm largura e 50 mm de comprimento, que possui um gradiente exponencial pré-definido e estável do antimicrobiano a ser testado [Figura 2].

Figura 2
Epsilometer test



Um dos lados da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em $\mu\text{g/mL}$ e um código de duas letras que identifica o antibiótico testado. A fita é aplicada sobre ágar previamente inoculado com o micro-organismo a ser testado e a placa é incubada por 16 a 24 horas. Ocorre formação de zona elíptica de inibição, determinando-se a CIM pela intersecção da elipse de

inibição com a tira de antimicrobiano. O *Etest*[®] tem se mostrado particularmente útil para a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias exigentes e anaeróbios, para os quais os sistemas automatizados revelam-se inadequados.

• Interpretação do antibiograma

Quando se determina pelo TSA que um micro-organismo é “susceptível”, significa que a droga testada deverá ser eficaz para a terapêutica da infecção, se empregada em doses adequadas. Os agentes infecciosos que apresentam susceptibilidade “intermediária” poderão não responder satisfatoriamente, mesmo quando a droga é administrada em doses ótimas. Os microrganismos categorizados com “resistentes” são os que não têm crescimento inibido em cultura, o que significa que não deverá ocorrer resposta clínica à terapêutica mesmo quando sejam utilizadas as doses máximas possíveis do antimicrobiano. É importante considerar que os limites que definem as categorias de susceptibilidade são dinâmicos e não raramente sofrem modificações, o que resulta na necessidade do laboratório de manter-se atualizado em relação à padronização internacional.

A análise dos resultados de cultura e antibiograma, contudo, não se faz apenas com a leitura das categorias de susceptibilidade. A interpretação de um antibiograma envolve uma análise crítica em relação aos resultados e deve ser feita levando-se em consideração as evidências clínicas. Como princípio e índice de qualidade, um antibiograma não deve utilizar marcas comerciais nos resultados, uma forma pouco sutil de direcionar a prescrição para uma determinada apresentação. O painel de drogas deve ser adequado, não devendo ser testados antimicrobianos que sabidamente não tem ação (ou que não possam ser úteis para avaliação mais precisa da resistência) contra o micro-organismo em questão e os que não podem ser empregadas na situação clínica em questão. Assim, além de revelar uma falha técnica, é irrelevante o registro da resistência de um gram-positivo a polimixina ou de um gram-negativo a um macrolídio, uma vez que para ambos isso é um fato conhecido. Da mesma forma é destituído de sentido anotar a sensibilidade à nitrofurantoína para uma bactéria que seja a causa de meningite, uma vez que esta droga está disponível exclusivamente para uso oral, atinge níveis séricos muito baixos e não se concentra no sistema nervoso central.

Deve ser observada também a coerência dos resultados. É previsível que um *S. aureus* sensível à penicilina também o seja à oxacilina. No entanto, é impossível que o *S. aureus* seja sensível à penicilina e resistente à oxacilina, ainda que o contrário seja comumente observado. Também não seria crível, por exemplo, que uma amostra obtida a partir de um processo infeccioso no tecido celular subcutâneo (*celulite*), tenha um Gram evidenciando cocos gram-positivos agrupados em cachos e uma cultura com crescimento de bastonetes gram-negativos.

Os resultados de sensibilidade registrados no TSA não devem diferir dos padrões esperados, como a resistência natural que apresenta a *Klebsiella pneumoniae* à ampicilina, a *Pseudomonas aeruginosa* ao cloranfenicol, o *Enterococcus faecalis* às cefalosporinas, a *Salmonella typhi* às tetraciclina etc. Da mesma forma, os padrões de sensibilidade de drogas pertencentes a grupos onde ocorra resistência cruzada devem ser uniformes. Assim, não seria coerente que um micro-organismo fosse sensível à doxiciclina e resistente à tetraciclina ou sensível ao ceftriaxone e resistente ao cefotaxime. Resultados diferentes destes padrões não devem ser levados em consideração para a determinação da terapêutica, uma vez que revelam falha na realização do TSA ou na identificação do micro-organismo.

6. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos

Todos os testes de confirmação diagnóstica podem produzir resultados falsos quando detectam a presença ou a ausência de determinada condição (infecção, doença etc.). A sensibilidade é capacidade de um teste detectar os indivíduos realmente portadores de uma condição. A especificidade é a capacidade de um teste discriminar os indivíduos realmente não portadores da condição. Estas duas características operacionais são fixas, considerando

lotes produzidos com um mesmo padrão de qualidade e executados com técnica correta, uma vez que não dependem do indivíduo testado ou da prevalência da condição na população. *Sensibilidade* e *especificidade* referem-se à proporção de acertos em relação aos critérios considerados como *padrão* (“padrão ouro”), hipoteticamente capazes de realmente *detectar* ou *excluir* a presença de uma determinada condição em todos os indivíduos testados.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Total de testes que detectaram a condição em portadores}}{\text{Total de indivíduos realmente portadores da condição}} * 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Total de testes que detectaram a ausência da condição em não portadores}}{\text{Total de indivíduos realmente não portadores da condição}} * 100$$

Os *valores preditivos* (VP) de um teste referem-se à proporção (percentual) de exames corretos entre o total de exames que detectaram a *presença* (VP+) ou a *ausência* (VP-) de uma condição. Os *valores preditivos*, ao contrário da *sensibilidade* e da *especificidade*, são influenciados pela prevalência (*probabilidade pré-teste*) da condição testada na população. Assim, o valor preditivo do teste que detecta a presença de uma condição (“positivo”) será proporcionalmente *mais elevado* quanto *mais alta* for a prevalência. Inversamente, o valor do preditivo do teste que detecta a ausência da condição (“negativo”) será proporcionalmente *mais elevado* quanto *mais baixa* for a prevalência. Em outras palavras, para aumentar os *valores preditivos* de um teste é necessário, de acordo com o objetivo, aumentar (no caso do VP+) ou diminuir (no caso do VP-) a *probabilidade pré-teste*, o que depende fundamentalmente da qualidade da avaliação clínica.

$$\text{VP+} = \frac{\text{Total de testes que detectaram corretamente a condição}}{\text{Total de testes que detectaram a condição}} * 100$$

$$\text{VP-} = \frac{\text{Total de testes que detectaram corretamente a ausência da condição}}{\text{Total de testes que detectaram a ausência da condição}} * 100$$

• Tabela de contingência

A construção de uma tabela de contingência (2*2) facilita a visualização, os cálculos e a análise das características operacionais de um teste. Assim, o exame de gota espessa corada pelo Giemsa é o teste padrão, contra o qual se comparam todos os outros, para a confirmação do diagnóstico de *malária*. Em um estudo comparativo entre um teste rápido e o exame microscópico (teste padrão), a gota espessa demonstrou a presença de parasitas em 69 dos 231 pacientes envolvidos. O teste rápido detectou a presença de parasitas em 56 indivíduos, dos quais 55 com resultados coincidentes com a gota espessa.

T e s t e	Malária (= gota espessa)		
	SIM	NÃO	
+	55	1	56
-	14	161	175
	69	162	231

Fonte: Jelinek et al., 2000.

Construindo uma tabela de contingência e possível calcular a *sensibilidade*, a *especificidade* e os *valores preditivos* do teste rápido. Convencionalmente a tabela de contingência é construída com o critério que define a presença ou ausência real da condição (padrão) anotado na posição *horizontal* e o teste com o qual é comparado na *vertical*.

Sensibilidade (S)

$$S = \frac{\text{Total de testes que detectaram a condição entre os portadores} = 55}{\text{Total de indivíduos realmente portadores da condição} = 69} * 100 = 79,71 \%$$

Especificidade (E)

$$E = \frac{\text{Total de testes que detectaram a ausência da condição em não portadores} = 161}{\text{Total de indivíduos realmente não portadores da condição} = 162} * 100 = 99,38 \%$$

Valor preditivo do teste “positivo” (VP+)

$$VP+ = \frac{\text{Total de testes que detectaram corretamente a condição} = 55}{\text{Total de testes que detectaram a condição} = 56} * 100 = 98,21 \%$$

Valor preditivo do teste “negativo” (VP-)

$$VP- = \frac{\text{Total de testes que detectaram corretamente a ausência da condição} = 161}{\text{Total de testes que detectaram a ausência da condição} = 175} * 100 = 92 \%$$

• Interpretação dos resultados

Os resultados demonstram que o teste rápido tem um desempenho bastante inferior ao do padrão (gota espessa), mesmo em ambiente de laboratório. A *sensibilidade* de cerca de 80% significa que, de cada 100 pessoas com *malária*, 20 não seriam diagnosticadas, ou seja, seriam dadas falsamente como não tendo a doença. A *especificidade* de cerca de 99% resulta em um diagnóstico falso de *malária* para cada 100 pessoas sem a doença.

Nesta população (231 pessoas) a *probabilidade pré-teste* de um indivíduo estar com *malária* é de cerca de 30% (prevalência). Neste contexto, quando teste rápido detecta uma pessoa como tendo *malária* (teste “positivo”), a probabilidade de estar correto (*probabilidade pós-teste*) sobe para cerca 98% (VP+). No entanto, deve-se levar em conta que cerca de 2% dos casos com *malária* (1 indivíduo, que seria tratado desnecessariamente) o teste “positivo” é falso.

Tabela 1

Uso de testes rápidos por viajantes: causa de falhas na autotestagem
(n=31, com possibilidade de mais de uma causa por pessoa)

Problema	Viajantes	%
Incapacidade de coletar o próprio sangue (punção digital)	22	71,0
Incapacidade de colocar a gota de sangue adequadamente no kit	8	25,8
Observação inadequada do tempo recomendado para a realização do exame	12	38,7
Incapacidade de identificar as bandas indicativas do resultado	18	58,1
Incapacidade de interpretar o resultado	27	87,1

Fonte: Jelinek et al., 2000.

A *probabilidade pré-teste* de um indivíduo não estar com *malária* é de cerca de 70%. Quando o teste rápido não detecta *malária*, a probabilidade de um indivíduo realmente não estar com a doença sobe para 92% (VP-). Não deve ser esquecido que em 8% dos casos dados como não tendo *malária* (14 indivíduos, que não seriam tratados) o resultado do teste “negativo” é falso,

o que poderia ter consequências graves e inclusive óbitos. Quando os testes rápidos são utilizados por viajantes (autotestagem) podem ocorrer falhas, que variam desde inabilidade do indivíduo em coletar o próprio sangue até a incapacidade de interpretar os resultados. Como parece claro, a realização do autoteste pode resultar em riscos significativos para o viajante[Tabela 1].

- **Avaliação clínica e valores preditivos**

A análise de dados adequadamente obtidos através da história do exame físico permite aumentar (ou diminuir) a *probabilidade pré-teste*, o que influencia os *valores preditivos* de um teste. Deve-se ter em mente que a *probabilidade pré-teste* (prevalência) **não altera a sensibilidade e a especificidade**, que são características fixas de um teste.

Quando a meta é elevar o *valor preditivo* de um teste para *detectar* uma determinada condição (VP+) deve-se, através da história e do exame físico, procurar aumentar a *probabilidade pré-teste*. Nas situações em que é desejável aumentar o *valor preditivo* de um teste para *detectar a ausência* (VP-) de uma condição, deve-se procura diminuir a *probabilidade pré-teste*. Desta forma, a solicitação de exames confirmatórios para *malária* em todas as pessoas que apresentem febre e que residam no Rio de Janeiro (uma área não endêmica) resultará (além do desperdício de recursos) em testes que detectarão a doença (resultados falsos) com *valores preditivos* (VP+) muito baixos, uma vez que a *probabilidade pré-teste* será próxima de zero. Quando o mesmo teste é solicitado para pessoas que residam no Rio de Janeiro, que apresentem febre e tenham *viajado para a Região Amazônica* (uma área endêmica para *malária*) se estará aumentando a *probabilidade pré-teste* e, com isto, o *valor preditivo* (VP+) do teste.

Para candidatos à doação de sangue, a triagem epidemiológica torna possível a exclusão de indivíduos que tenham comportamento de risco para a aquisição de infecções pelos vírus causadores de hepatites e da imunodeficiência. Além disto, também possibilita a exclusão de candidatos oriundos de áreas de transmissão de malária ou da doença de Chagas. Em outras palavras, a triagem clínica permite reduzir a *probabilidade pré-teste* (prevalência) de infecções na população de doadores. Apenas os considerados aptos pela triagem clínica são submetidos aos testes sorológicos, visando a detecção de infecções assintomáticas, o que aumenta os *valores preditivos* dos exames não-reativos.

A prática (comum) de oferecer aos doadores os resultados dos testes de triagem como "recompensa" para a doação, levada ao extremo em um Hospital Universitário do Grande Rio, que em 1988 solicitava através de cartazes "*Se você quer saber se tem: Aids, hepatite, Doença de Chagas, doe sangue no Banco de Sangue (...)*" deve ser desestimulada por motivos óbvios, entre os quais o de atrair um maior número de indivíduos que se reconhecem sob risco, numa perversão completa do que se entende por autoexclusão. Ou seja, esse tipo de campanha resulta em aumenta a prevalência de infecções entre os doadores e, portanto, reduz os *valores preditivos* dos exames não-reativos o que, necessariamente, eleva o risco de transmissão de infecções transfusionais.

Referências bibliográficas

- AAGAARD, K, ANN LUNA, R & VERSALOVIC, J The Human Microbiome of Local Body Sites and Their Unique Biology. In: BENNETT, J.E; DOLIN, R. & BLASER, M.J. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. New York, Churchill Livingstone, 2015. 2v.
- BARON EJ, MILLER JM, WEINSTEIN MP *et al.* A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 57 (4): e22-e121, 2013.
- BELL, D, WANGSRICHANALAI, C & BARNWELL, JW. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nature* 4: 682-695, 2006.
- CHAPIN, KC & MURRAY, PR Principles of Stain and Media. In: MURRAY, PR, BARON, EJ, PFALLER, MA JORGENSEN, JH. & YOLKEN, RH (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2003.
- GRANATO, PA. Pathogenic and Indigenous Microorganisms of Humans. In: MURRAY, PR, BARON, EJ, PFALLER, MA JORGENSEN, JH. & YOLKEN, RH (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2003.

- GRAY LD, FEDORKO DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(2):130-145.
- ISENBERG, H.D. & D'AMATO, R.F. Indigenous and Pathogenic Microorganisms of Humans. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C. & YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Am. Soc. Microbiol. Washington, 1995.
- ISENBERG, H.D. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Am. Soc. Microbiol. Washington, 1995.
- JELINEK, T, GROBUSCH, MP & NORTHDURFT, HD. Use of Dipstick Test for the Rapid Diagnosis of Malaria in Nonimmune Travelers. *J Travel Med*, 7:175-9, 2000.
- JONES, TF, GERNER-SMIDT P. Nonculture diagnostic tests for enteric diseases. *Emerg Infect Dis*.18 (3): 513-14, 2012.
- KOTHARI, A, MORGAN, M & HAAKE, DA. Emerging Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens. *Clin Infect Dis* 59 (2): 272-278, 2014.
- KOTHARI, A, MORGAN, M & HAAKE, DA. Emerging Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens. *Clin Infect Dis* 59 (2): 272-278, 2014.
- MANDELL, LA, BARTLETT, JG, DOWELL, SF *et al.* Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 37:1405-33, 2003.
- MANDELL, LA, WUNDERINK, RG, ANZUETO, A *et al.* Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis* 44 (S2), 2007.
- MARTINS, FSV, CASTIÑEIRAS, TMPP & PEDRO, LGF Infecções, Doenças e Imunidade In: MARTINS, FSV, CASTIÑEIRAS, TMPP & PEDRO, LGF *Guia de Saúde do Viajante*. Petrobras, Rio de Janeiro, 2004.
- MURRAY, PR. The Clinician and the Microbiology Laboratory. In: BENNETT, J.E; DOLIN, R. & BLASER, M.J. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. New York, Churchill Livingstone, 2015. 2v.
- MUSHER, DM, BARTLETT, JG & DOERN, GV. A fresh look at the definition of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to beta-lactam antibiotics. *Arch Intern Med*: 161:2538 -2544, 2001.
- NACIONAL COMITEE FOR CLINICAL STANDARD. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *NCCLS document M100-S14*. 14th ed. Pennsylvania, 2004.
- NADEL S, BRITTO J, BOOY R, MACONOCHE I, HABIBI P, LEVIN M. Avoidable deficiencies in the delivery of health care to children with meningococcal disease. *J Accid Emerg Med* 15 (5):298-303, 1998.
- PETTI CA, POLAGE CR & HILLYARD DR. Screening laboratory requests [letter]. *Emerg Infect Dis*. 12 (11): 1792-93, 2006.
- RAMOS FILHO & MARTINS, FSV. *Solicitação e interpretação de testes confirmatórios*. Texto didático. Departamento de Medicina Preventiva da FM-UFRJ, 1992.
- RELMAN, DA & FALKON, S. A molecular perspective of Microbial Pathogenicity. In: BENNETT, J.E; DOLIN, R. & BLASER, M.J. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. New York, Churchill Livingstone, 2015. 2v.
- SEWELL, DL & MacLOWRY, JD. Laboratory Management. In: MURRAY, PR, BARON, EJ, PFALLER, MA JORGENSEN, JH. & YOLKEN, RH (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2003.
- STEVENS, DL, BISNO, AL, CHAMBERS, HF *et al.* Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft-Tissue Infections. *Clin Infect Dis* 59 (2): 10-52, 2014.
- THOMPSON JR, RB & MILLER, JM. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In: MURRAY, PR, BARON, EJ, PFALLER, MA JORGENSEN, JH. & YOLKEN, RH (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2003.
- WILSON, ML & GAIDO, L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 38: 1150-58, 2004.
- WOODS, GL & WASHINGTON, JA. In Vitro Testing of Antimicrobial Agents. In: HENRY, JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996.
- WOODS, GL, AYERS, LW & WASHINGTON, JA. Medical Bacteriology. In: HENRY, JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996.