

Bases racionais para a solicitação e interpretação de testes diagnósticos em doenças infecciosas

Rational bases for requesting and interpreting diagnostic tests in infectious diseases

Fernando S.V. Martins (*in memoriam*)

Professor Adjunto de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, UFRJ

Responsável pela criação do Centro de Informação para Viajantes (Cives), UFRJ

Terezinha Marta Pereira Pinto Castiñeiras

Professora Associada de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, UFRJ

Diretora do Núcleo de Enfrentamento e Estudos de Doenças Infecciosas Emergentes e Reemergentes (NEEDIER), UFRJ
Membro da Equipe Médica do Centro de Informação em Saúde para Viajantes (Cives), UFRJ

Luciana Gomes Pedro Brandão

Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa em Imunização e Vigilância em Saúde (LIVS), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Anna Carla.P. Castiñeiras

Médica Infectologista da Equipe do NEEDIER e da CCIH/HUCFF
Professora da Disciplina de Infectologia da UNESA.

Nelson G. Pereira

Professor Associado de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, UFRJ (aposentado).
Professor das Disciplinas de Infectologia da UNESA e da FTESM.

Correspondência

Terezinha Marta Pereira Pinto Castiñeiras

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Av. Carlos Chagas Filho, 791, Quadra F - Cidade Universitária
Rio de Janeiro-RJ CEP: 21941-599
E-mail: tmartapc@medicina.ufrj.br

RESUMO

Em Medicina, a formulação de hipóteses diagnósticas é feita através de informações 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 de informações clínicas e epidemiológicas cuidadosamente obtidas. Adicionalmente, a solicitação racional de qualquer exame complementar deve ter um objetivo predeterminado 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 desnecessários e podem trazer prejuízos para o paciente ao retardar o correto diagnóstico ou resultar em uso inadequado de antimicrobianos. Ademais, repercutem negativamente na instituição, elevando desnecessariamente o custo do atendimento. A despeito de todo avanço tecnológico que marcou as últimas décadas, da disponibilização de técnicas automatizadas e da integração da genômica e proteômica na microbiologia, a correta interpretação do resultado que repercutirá na estratégia de intervenção mais eficiente para o paciente ainda depende da racionalidade da escolha do teste a ser realizado e da qualidade da amostra que for coletada, transportada e recebida para processamento e análise.

Palavras-chave: infecção; diagnóstico; laboratório; amostra; cultura; antibiograma

ABSTRACT

In Medicine, the formulation of diagnostic hypotheses is based on information obtained through anamnesis and physical examination. The appropriate request for complementary tests (laboratory, imaging), when necessary to confirm or rule out diagnostic hypotheses, should be made based on carefully obtained information. Additionally, the rational request for any complementary test should have a predetermined objective and be capable of resulting in a consequence. In other words, the physician must know why he or she is requesting a test and what the usefulness of the result will be for the patient or the population. Tests requested without observing these two basic principles are often unnecessary and can harm the patient by delaying the correct diagnosis or resulting in inappropriate use of antimicrobials. Furthermore, they have a negative impact on the institution, unnecessarily increasing the cost of care. Despite all the technological advances that have marked the last decades and notably the availability of automated techniques and the integration of genomics and proteomics in microbiology, the correct interpretation of the result that will have a positive impact on the most efficient intervention for the patient, still depends on the rationality of the choice of the test to be performed and the quality of the sample that was collected, transported and received for processing and analysis.

Keywords: infection; diagnosis; laboratory; specimen; culture

INTRODUÇÃO

Em essência, a investigação diagnóstica ideal envolve a realização do teste apropriado para o paciente em foco, por questões precisas, no

momento certo, com a interpretação pertinente, que resulta na abordagem adequada e eficiente, otimizando o cuidado do paciente. O processo investigativo desencadeado a partir da suspeita diagnóstica até a interpretação do resultado do teste laboratorial envolve três fases distintas: pré-analítica, analítica e pós-analítica.^(1,2) Os clínicos, os microbiologistas, os profissionais de suporte em saúde estão todos envolvidos em diferentes fases do processo.

O impacto do processamento de amostra apropriada no cuidado do paciente é imensurável. É a ferramenta decisiva para o diagnóstico laboratorial acurado, afeta diretamente o cuidado e o prognóstico do paciente, influencia as decisões terapêuticas e contribui para o uso racional de antibióticos.^(2,3) Ademais, no cenário hospitalar, contribui para o controle de infecção hospitalar, influencia o tempo de internação, impactando o custo da assistência hospitalar.

CONCEITOS BÁSICOS EM MICROBIOLOGIA

Para delinear uma estratégia racional de solicitação e interpretação de exames complementares no contexto das doenças inflamatórias pélvicas (DIP), é fundamental uma melhor compreensão de conceitos básicos que norteiam as práticas microbiológicas.

Microbioma & microbiota residente

O termo microbioma se refere à 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.^(4,5) Em seu conjunto, o genoma microbiano excede em mais de 100 vezes o genoma humano,⁽⁶⁾ e a contagem de células da microbiota residente, quando consideradas apenas bactérias, se equivale ou excede ligeiramente a contagem de células humanas,⁽⁷⁾ porém pode atingir a clássica relação de 10:1, se vírus, fungos e protozoários forem contabilizados.⁽⁵⁾

Por muito tempo acreditou-se que durante a gestação o ser humano desenvolve-se em um ambiente isento de microrganismos. Evidências mais recentes, entretanto, sugerem que a exposição inicial aos microrganismos acontece ainda em fase intrauterina, e embora não seja possível afirmar que a colonização se estabeleça nesta etapa, esta exposição precoce pode promover tolerância imune e facilitar a colonização na fase neonatal.^(8,9) A colonização se faz inicialmente por microrganismos de origem materna e se expande progressivamente, através da aquisição de microrganismos no contato com outras pessoas. Em algumas semanas, complexas comunidades microbianas se consolidam em diferentes nichos corporais, estabelecendo progressivamente padrão de distribuição e funcionalidade.⁽⁸⁾ No trato gastrointestinal, a microbiota fecal continua sua maturação durante os dois a três primeiros anos de vida, e a partir desta fase se aproxima do perfil do adulto.⁽¹⁰⁾

A microbiota humana é essencial à vida e desempenha funções importantes na digestão de alimentos e produção de fatores nutricionais e constitui um importante mecanismo de defesa na proteção contra a invasão por agentes infecciosos.^(4,5,6) Apesar de toda relevância na manutenção da homeostase, na microbiota também estão presentes micróbios que podem atuar como oportunistas, tipicamente colonizando o hospedeiro humano sem causar dano, mas com capacidade potencial de causar infecção e doença em contexto de imunossupressão ou secundariamente às rupturas dos mecanismos de defesa, ou seja, podem atuar como patógenos secundários.

A colonização resulta no estabelecimento de diferentes comunidades microbianas em áreas corporais diversas, primariamente nas superfícies (internas e externas), incluindo o trato gastrointestinal, a pele, a mucosa oral, a mucosa genital e a conjuntiva.^(5,11,12) No trato gastrointestinal, a imensa maioria das bactérias comensais reside no cólon (10^{14}). A concentração bacteriana no estômago, duodeno e jejuno proximal é substancialmente menor (10^3 – 10^4). Em paralelo, a pele também é intensamente colonizada (10^{12}).

Alguns sítios corporais, em condições habituais, são praticamente destituídos de microbiota residente (sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, líquido sinovial, tecido celular subcutâneo etc.). É importante destacar que algumas áreas, ainda que habitualmente estéreis, têm comunicação com locais que possuem abundante

microbiota residente.^(12,13) Assim, o trato urinário é praticamente isento de microbiota em quase toda sua extensão, mas a urina coletada espontaneamente recebe bactérias durante a passagem pela uretra anterior.

O significado clínico do isolamento em cultura de microrganismos 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 superficial proveniente de uma lesão de pele (onde existe abundante microbiota), como uma escara de decúbito, não pode ser tomada como expressão da absoluta 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 microrganismos que usualmente não fazem parte da microbiota residente, porém podem causar infecções, são denominados patógenos primários.

Agentes infecciosos, infecções e doenças

A interação inicial de um microrganismo com as células humanas pode resultar

em *aderência*. A complexidade das ferramentas utilizadas pelo microrganismo para adesão celular (adesinas) varia de uma simples proteína monomérica a intrincadas macromoléculas que executam funções sofisticadas.⁽¹⁴⁾ Para que o processo de aderência se efetive, as adesinas do microrganismo interagem com os receptores das células do hospedeiro (Quadro 1). A existência de receptores livres é condição primordial para a fixação inicial, viabilizando, ou não, a colonização subsequente.

A *colonização* é a instalação de microrganismos 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.

Infecção 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 microrganismos (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, covid-19, dengue, difteria, febre amarela, gonorreia), semanas (varicela, caxumba), meses (hepatites virais, calazar) ou anos (hepatites B e C, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV e vírus linfotrópico de células T humanas – HTLV).

Quadro 1

Exemplos de adesinas microbianas e receptores celulares

Adesinas microbianas	Receptores celulares
<ul style="list-style-type: none">• Lecitinas• Fimbrias/<i>pilli</i>• Glicocálix• Lipídios• Proteínas do capsídeo viral (p.ex., proteína S do SARS-CoV2)	<ul style="list-style-type: none">• Polissacarídeos (ácido siálico, galactose)• Integrinas• Proteínas de transporte• Receptores de complemento• Componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina)• Enzimas (p.ex., ECA-2)

Agente etiológico é o microrganismo 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.

Mecanismos de transmissão dos agentes infecciosos

Os seres humanos são, comumente, a principal fonte dos microrganismos capazes de infectá-los.⁽¹⁵⁾ A infecção pode ser de natureza endógena, quando o agente invasor é um componente da microbiota residente do próprio indivíduo suscetível (p.ex., *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 suscetível (não imune), como ocorre entre parceiros no caso das infecções 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, da covid-19, da coqueluche, do sarampo, da varicela, da caxumba, da rubéola, da difteria, da meningite meningocócica, entre outros. Além disso, alguns agentes são capazes de permanecer viáveis no interior de pequenas partículas em suspensão no ar (aerossóis) e podem ser inalados por outros indivíduos suscetíveis, mesmo quando a fonte de contaminação ambiental não está efetivamente próxima no momento da transmissão, como ocorre com relativa frequência na tuberculose, e na 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, hepatite C, infecção pelo HIV, malária, doença de Chagas etc.) após transfusões de hemoderivados, acidentes perfurocortantes, exposição de mucosas, compartilhamento de agulhas e de objetos cortantes.

A transmissão pode envolver a participação de vetores. Os vetores podem ser mecânicos, servindo apenas de meio de transporte do agente até o indivíduo

suscetível (baratas e moscas podem transportar *Salmonella typhi*) ou biológicos, comumente artrópodes (como os insetos hematófagos), neles ocorrendo, obrigatoriamente, parte do ciclo de desenvolvimento dos agentes infecciosos, tal como ocorre na malária, febre amarela, dengue e 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 suscetível em exposições ocasionais, 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.

Mecanismos de defesa

Os seres humanos são dotados de mecanismos de defesa que dificultam a penetração, a implantação e a multiplicação

de agentes infecciosos. Em essência, estes mecanismos se dividem em inatos e adquiridos. A primeira linha de defesa é conferida pelo sistema imune inato, herdado geneticamente dos progenitores e presente ao nascimento.⁽¹⁶⁾ Esse sistema se distingue pela capacidade de resposta rápida e inclui componentes diretamente relacionados ao hospedeiro, como barreiras físicas, diversos tipos celulares, receptores, sensores e citocinas, e aqueles associados ao microbioma humano.

A barreira mais externa do sistema inato é de natureza físico-química, sendo representada pela pele e mucosas íntegras, pela ação de enzimas presentes na saliva, na lágrima e nas secreções nasais, pela acidez gástrica e urinária, entre outros mecanismos. Quando um agente infeccioso consegue vencer estes obstáculos iniciais, terá de enfrentar uma segunda barreira, que corresponde a um conjunto de células (neutrófilos e macrófagos) e substâncias liberadas por células (interferons e citocinas). As células do sistema imune inato são dotadas de receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos em geral (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), o que resulta em resposta protetora diferenciada.⁽¹⁷⁾

Interessante que os mecanismos desencadeados para o reconhecimento e destruição de microrganismos patogênicos e que dão início à resposta inflamatória também eliminam células humanas infectadas e

danificadas. Por outro lado, os componentes dessas células destruídas terão papel relevante na regulação da inflamação e manutenção da homeostasia.

O sistema imune inato é um poderoso recurso de defesa, entretanto a eficiência plena de resposta protetora requer a atuação de anticorpos e células sensibilizadas que integram a imunidade adquirida (adaptativa ou específica). O sistema inato se comunica diretamente, célula a célula, com o sistema adaptativo e, adicionalmente, libera mediadores que ativam e instruem a resposta adquirida e contribuem para o desenvolvimento de memória imunológica.

O sistema imune adaptativo é o responsável pela resposta imunológica específica, de natureza humoral e celular. A resposta imune humoral corresponde à resposta mediada por anticorpos. É dividida em duas fases, a primária e a secundária. A resposta imune humoral primária é desencadeada pela ligação do antígeno ao receptor de células B *naive*, promovendo a ativação, proliferação e diferenciação desta célula, que resulta na produção de anticorpos.⁽¹⁸⁾ Os linfócitos B ativados promovem a atividade da deaminase, que media a troca de classe das imunoglobulinas (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE) antes da entrada nos centros germinativos. A troca de classe é útil para adequar a função efetora do anticorpo, sem, entretanto, alterar o antígeno que será reconhecido.

Os antígenos que estimulam linfócitos B podem fazê-lo diretamente

(timo-independentes) ou requerer a participação de células T (timo-dependentes). Neste último caso, os linfócitos B se diferenciam em células de memória, de longa duração, o que geralmente se dá nos centros germinativos.⁽¹⁹⁾ Em uma exposição subsequente ao mesmo antígeno, essas células de memória responderão prontamente e com grande eficiência, conduzindo a rápida produção de anticorpos específicos, caracterizando a resposta imune humoral secundária.

Na resposta imune adquirida celular, os linfócitos T desempenham o papel central, assegurando especificidade antigênica de resposta e, ao mesmo tempo, orquestrando a atividade antimicrobiana não específica das células do sistema imune inato e promovendo a destruição de células humanas infectadas.⁽²⁰⁾ A indução de resposta mediada por linfócitos T depende primariamente das células dendríticas que trafegam da porta de entrada da infecção aos órgãos linfoides periféricos (linfonodos) para apresentar o antígeno. As células T expressam receptores que detectam peptídeos derivados de patógenos apresentados pelas moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major compatibility complex*). O encontro primário de células T *naive* com o antígeno microbiano resulta em ativação, proliferação e diferenciação de células T efetoras, que facilitam a erradicação do patógeno. Em sequência, emergem células T de longa duração, promotoras de memória.

De forma resumida, ao invadir o organismo humano, um agente infeccioso – que geralmente contém vários antígenos – é inicialmente reconhecido pelo sistema imune inato como estranho ou invasor. Em sequência, se desenvolve a resposta imune adquirida primária, que envolve a produção de anticorpos e de células de memória. As células de memória, em um futuro contato com o mesmo agente infeccioso, são capazes de rapidamente voltar a produzir anticorpos específicos (resposta imunológica secundária) contra o invasor.

PRESUNÇÃO DA ETIOLOGIA DE UM PROCESSO INFECCIOSO

A presunção do diagnóstico de um determinado processo infeccioso deve ter como base fundamental as evidências clínicas e epidemiológicas. É fundamental avaliar cuidadosamente se houve uma possível exposição a um agente específico (oportunidade de infecção) e se o tempo decorrido entre a aquisição da infecção e o desenvolvimento das manifestações clínicas de doença (período de incubação) é compatível com 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 presumidas 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 si*, 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 disso, a presença de baço palpável

e icterícia também é comum em diversas outras doenças infecciosas.

Em condições naturais, a malária é 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 ilícitas 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 a cidade do Rio de Janeiro), ainda que exista o risco de ocorrer eventualmente episódios de reintrodução da malária e casos esporádicos causados por *Plasmodium simium* (Região Serrana), o dado comum à quase totalidade dos casos de malária é a história de viagem a uma área de transmissão ativa (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 ilícitas endovenosas etc.) devem ser investigadas. Intuitivamente, 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.

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”).

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.⁽³⁾ 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 de compartilhar responsabilidade na orientação da coleta de espécimes. Material clínico coletado, transportado ou processado de forma inadequada tende a gerar resultados imprecisos e pouco confiáveis.

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 microrganismos na amostra a ser processada, posteriormente interferir com o crescimento *in vitro*.^(3,21) 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 estejam indicados. Nestas circunstâncias é fundamental que a equipe do laboratório de microbiologia esteja ciente dos medicamentos 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 relacionar 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.^(22,23) 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* spp. pode ser realizado com relativa facilidade pela detecção de antígeno específico na urina.⁽²⁴⁾ 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 do posto de enfermagem 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, dado que o resfriamento poderá inibir a multiplicação bacteriana.⁽³⁾ Adicionalmente, a refrigeração de materiais (*swab* uretral, aspirados) destinados a culturas para *Neisseria gonorrhoeae* praticamente inviabiliza o isolamento em cultura, em decorrência da perda de viabilidade bacteriana.

É desejável que instruções para coletas diferenciadas estejam facilmente acessíveis. Além disso, 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 sepse ou endocardite,

mesmo antes da identificação completa e da realização do antibiograma.

É recomendável 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 microrganismos. Por vezes, amostras provenientes de diferentes materiais (líquido sinovial, aspirado de vesícula, entre outros) podem ser inoculadas diretamente em frascos com meios de cultivo apropriados, imediatamente após coleta. Além disso, frascos contendo meio de cultura podem ser úteis para transporte de amostras que contém bactérias que perdem rapidamente a viabilidade, como a *Bordetella pertussis* (meio de *Regan-Lowe*)

Todos os recipientes (frascos, tubos, lâminas, *swabs* etc.) contendo amostras biológicas para diagnóstico devem ser cuidadosamente identificados quando 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 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 recomendável que o médico solicitante

se identifique de forma clara e forneça alternativa de contato (telefone, WhatsApp, e-mail) para facilitar a troca de informações com o laboratório.

Coleta de material em áreas que possuem microbiota residente

A cultura de material coletado de locais que possuem uma microbiota residente tem, com frequência, 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

As infecções da pele e do tecido celular subcutâneo ocorrem quando as barreiras protetoras são rompidas, principalmente em decorrência de traumas variados, perfusão sanguínea inadequada e inflamação local. Comportam um amplo espectro de infecções, manifestas usualmente com acometimento leve (impetigo, ectima, foliculite, furúnculo), moderado (erisipela, celulite)

e grave (comprometimento de planos profundos como fáscia e estruturas musculotendinosas e, por vezes, necrosante).

A pele é dotada de numerosa microbiota residente. Comumente, as infecções cutâneas primárias são causadas por microrganismos presentes na microbiota da pele, de forma permanente ou transitória, com destaque ao *Staphylococcus aureus* (foliculite, furúnculo, celulite) e o *Streptococcus pyogenes* (impetigo, erisipela). As infecções cutâneas secundárias são processos infecciosos associados a condições preexistentes que funcionam como porta de entrada, frequentemente são de natureza polimicrobiana (aeróbios e anaeróbios) e atingem tecido subcutâneo, como é o caso das infecções que se instalam na úlcera neuropática do pé diabético e na escara de decúbito.⁽²⁵⁾ Em cenários extremos, como nas infecções necrosantes rapidamente progressivas, é comum que o *Streptococcus pyogenes* esteja envolvido, eventualmente *Staphylococcus aureus* ou *Klebsiella pneumoniae*, em associação com espécies anaeróbicas. A despeito de geralmente decorrerem de ação traumática, a fasciíte necrosante pode se instalar sem trauma evidente.

De uma forma geral, no contexto das infecções de pele e subcutâneo não complicadas, passíveis de tratamento ambulatorial, as culturas não são rotineiramente recomendadas.^(25,26,27) Nos casos típicos de erisipelas e celulites, o rendimento de aspirados teciduais é baixo, variando de 5% a 20%, não justificando a coleta de materiais

para isolamento. Contudo, ainda que se trate de furunculose, quando é maior a possibilidade de envolvimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), a cultura poderá ser útil no direcionamento terapêutico.

Nas infecções que requerem drenagem, é importante coletar material para cultura e viabilizar a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. O mesmo se aplica em quadros mais graves com repercussão sistêmica ou nos quadros infecciosos que acometem indivíduos imunossuprimidos ou neutropênicos, cenários que justificam, além da coleta de material do local da infecção, amostras de hemoculturas.

Em razão da numerosa microbiota cutânea, 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 abertas 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. Na abordagem dessas lesões, o recomendável é realizar o desbridamento das camadas superficiais (geralmente um macerado de células mortas e

contaminantes) e coletar amostra tecidual mais profunda, com mais representatividade, para a cultura.^(3,27)

Cabe ressaltar, entretanto, que quando o agente presumido como causador da lesão ulcerada não faz parte da microbiota habitual de pele, de forma excepcional, a coleta de material para cultura poderá ser realizada por *swab* e raspado. Neste cenário, o resultado valorizável é a confirmação da presença de agente específico, como no caso da difteria cutânea (*Corynebacterium diphtheriae*).

Nas lesões fechadas (bolhas, abscessos, furúnculos), o material poderá ser obtido por aspiração com seringa e agulha estéreis; os resultados de isolamento terão utilidade clínica.

Oro / nasofaringe

A oro / nasofaringe possui numerosa microbiota residente. A bacterioscopia pelo Gram de materiais coletados destes locais não tem, em geral, utilidade clínica, pois não permite a diferenciação morfológica entre os patógenos e os componentes da microbiota habitual e nenhum recurso laboratorial quantitativo foi estabelecido de modo a tornar possível uma correlação acurada. Por outro lado, ferramentas como teste de antígenos, cultura e testes moleculares podem ter utilidade e impactar na conduta terapêutica.

As faringites agudas, em qualquer faixa etária, são mais frequentemente causadas

por vírus e não têm tratamento específico. Entretanto, 10% a 15% das faringites dos adultos e 15% a 30% das faringites que acometem crianças são causadas pelo *Streptococcus pyogenes* e requerem tratamento antimicrobiano, no intuito de reduzir complicações supurativas e não supurativas.⁽²⁸⁾ A concomitância de fatores epidemiológicos e a superposição de manifestações clínicas dificulta o diagnóstico etiológico preciso das faringoamigdalites em bases clínicas, ressaltando-se que mesmo a aplicação de critérios diagnósticos clínicos clássicos, como o de Centor e McIsaac, não resulta em ganho efetivo de acurácia.⁽²⁹⁾ Consequentemente, a confirmação laboratorial é a ferramenta crucial para guiar a terapêutica racional das faringoamigdalites, conduzindo ao uso de antibiótico quando de fato necessário, ao mesmo tempo que reduz os inconvenientes do uso desnecessário de antimicrobianos. Para viabilizar a confirmação, os recursos laboratoriais mais utilizados no diagnóstico da faringoamigdalite estreptocócica são o teste rápido de antígeno e a cultura de *swab* de orofaringe.

O teste rápido de antígeno estreptocócico tem a vantagem de ser simples e ágil, permitindo seu uso no local do atendimento. É particularmente útil quando as evidências clínicas apontam para maior probabilidade de etiologia bacteriana (presença de febre alta, placas amigdalíneas e linfonodomegalias, e ausência de tosse, espirro e coriza). Neste cenário, o teste rápido antigênico positivo confirma o diagnóstico, dispensando

a cultura. Cabe ressaltar que a negatividade do teste de antígeno não exclui a infecção estreptocócica, o que torna recomendável complementar com a cultura. Contudo, com a perspectiva de introdução de teste molecular estreptocócico,⁽³⁰⁾ certamente de maior sensibilidade que o teste de antígeno, é possível que a cultura complementar, diante de resultado negativo, não seja mais rotineiramente necessária.

A cultura de *swab* de orofaringe também pode ser útil na investigação de caso suspeito de difteria (*Corynebacterium diphtheriae*). Adicionalmente, podem ser empregadas na identificação de portadores assintomáticos de agentes potencialmente capazes de causar doença (patógenos primários), como *C. diphtheriae* e *Neisseria meningitidis*.

No que diz respeito às causas virais de faringoamigdalite, usualmente não é essencial definir etiologia, dado que quase sempre não está disponível recurso terapêutico específico. Naturalmente, o recurso laboratorial pertinente (molecular e/ou sorológico) poderá ser considerado, se a confirmação repercutir na conduta terapêutica, tal como pode ocorrer nas infecções pelo vírus herpes simples (HSV), pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Trato respiratório inferior

Até bem recentemente, se acreditava que o trato respiratório inferior era estéril. Contudo, a implementação de procedimentos

de coleta de amostras respiratórias rigorosamente protegidos e a reprodutibilidade de achados em diferentes estudos têm revelado a existência de uma microbiota pulmonar complexa.⁽³¹⁾ Esta microbiota de certa forma espelha a microbiota oral, sugerindo que possa resultar de eventos de microaspiração continuados. Diante deste achado, a explicação para a gênese da pneumonia não se resume à invasão de um espaço estéril por um microrganismo proveniente da orofaringe, mas possivelmente resulta de um estado de ruptura da homeostasia do complexo ecossistema microbiano pulmonar.

O escarro expectorado pode conter microrganismos diversos, provenientes de pontos distintos da árvore respiratória. Acresce, a possibilidade de “contaminação” adicional pela vasta microbiota da orofaringe durante a passagem do escarro (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 broncoalveolar, em razão da passagem do material ou do dispositivo de coleta pela orofaringe. As culturas, no entanto, são indiscutivelmente úteis no caso de suspeita de doenças, como a tuberculose, causadas por agentes que não façam parte da microbiota residente local.

Não obstante a constituição microbiana diversa e a presumível contaminação da secreção expectorada, uma amostra de escarro adequadamente colhida e corada

pelo método de Gram poderá ser útil na avaliação etiológica das pneumonias. Na análise da bacterioscopia pelo Gram do escarro, a primeira etapa consiste em verificar a representatividade da amostra coletada, que deverá ter 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 à avaliação quantitativa e morfotintorial da bactéria predominante e a sua localização intra e extraleucocitária. Em um Gram de escarro com mais de 25 polimorfonucleares e menos de 10 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 mais cautela e é fundamental que o resultado da cultura seja interpretado em conjunto com os achados da bacterioscopia inicial. Nos casos em que seja desejável

realizar cultura para a obtenção de antibiograma (pneumonias graves, possibilidade de agentes resistentes aos fármacos 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 os da demonstração direta pelo Gram.

De uma forma geral, a maioria dos *guidelines* não recomenda a realização do Gram de escarro na abordagem das pneumonias no contexto ambulatorial, sendo proposto o tratamento empírico direcionado às etiologias presumidas.⁽³²⁾ Contudo, o exame

Quadro 2

Material de origem respiratória: cultura quantitativa

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

é extremamente simples, de baixo custo, rápido e produz informações úteis e confiáveis. Consequentemente, 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, não somente no contexto hospitalar, mas também no ambulatorial.

O *Streptococcus pneumoniae* (cocos Gram-positivos dispostos predominantemente em pares) persiste como o principal agente etiológico das pneumonias agudas comunitárias (PAC), embora um certo declínio tenha sido observado com a introdução e uso sistemático de vacinas antipneumocócicas conjugadas. O segundo agente mais comum é o *Haemophilus influenzae* (coco-bacilos Gram-negativos), seguido por *Staphylococcus aureus* (cocos Gram-positivos dispostos em cachos) e enterobactérias (bacilos Gram-negativos).⁽³³⁾ Com o uso progressivo de testes moleculares, tem sido possível estabelecer a participação viral na etiologia das pneumonias e a ocorrência de coinfeção viral-bacteriana.

Trato urinário

Os rins, os ureteres, a bexiga e a porção proximal da uretra, até bem recentemente eram considerados isentos de microrganismos. Entretanto, à semelhança do que foi demonstrado no trato respiratório inferior, as evidências obtidas com a utilização de

técnicas moleculares (como o sequenciamento do gene 16S rRNA) e técnicas aprimoradas de cultivo microbiológico, apontam para a existência de uma microbiota urinária própria na bexiga.⁽³⁴⁾ Diante deste achado, a explicação para a gênese das infecções do trato urinário parece não se resumir à invasão de um espaço estéril por um microrganismo proveniente da uretra anterior, mas possivelmente reflita um estado de desbalanço do ecossistema microbiano urinário. Estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel do microbioma na patobiologia da infecção do trato urinário.

Reconhecidamente, a porção distal da uretra (ou uretra anterior) possui uma numerosa microbiota residente.⁽³⁵⁾ Durante a micção espontânea, a passagem pela uretra anterior contribui para a contaminação substancial da urina. Para minimizar essa contaminação durante a coleta da urina para cultivo microbiológico, o primeiro jato de urina deve ser desprezado, utilizando-se o segundo jato, também referenciado como intermediário ou médio.

A prática de higienização da genitália antecedendo a coleta da urina por micção espontânea é bastante difundida. Contudo, não há evidências científicas de que a higienização da genitália (feminina inclusive) reduza a contaminação. Ademais, o procedimento pode, particularmente na presença de sintomas, estimular a micção imediata, o que dificulta a coleta quando é utilizada a primeira urina da manhã e a bexiga está repleta. Se a opção for realizar

a higienização, deve ser evitado o uso de soluções detergentes, pois o resíduo poderá contaminar a urina coletada. Cabe ressaltar, entretanto, que é importante afastar os grandes lábios (mulheres) e retrair o prepúcio (homens) e desprezar o jato inicial.⁽³⁶⁾

A contaminação também pode ocorrer quando a urina é obtida através de cateterismo, em função da passagem do cateter pela uretra anterior.⁽³⁷⁾ Nestes casos, à semelhança da micção espontânea, recomenda-se desprezar o jato inicial (10mL a 15ml). Contudo, nesta circunstância, está indicada a antisepsia da genitália antes da inserção do cateter, com o intuito de reduzir o risco de infecção secundária ao procedimento.⁽³⁾ No caso de coleta de urina por meio de cateter de demora, o conteúdo do cateter e da bolsa coletora deve ser esvaziado e o circuito coletor clampeado abaixo do nível da porta de amostra, por 15 a 30 minutos. Em seguida, com uso de luvas estéreis, deve ser realizada a assepsia da porta de amostra com gaze e álcool 70%, antes de inserir a agulha com a seringa para aspirar urina. A amostra coletada é então transferida para recipiente estéril, a agulha e seringa descartadas na caixa de perfurocortante e o *clamp* removido do circuito coletor.

A urina é um excelente meio de cultivo para muitas bactérias. 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 entre 2°C e 8°C, por não mais que 24 horas.⁽³⁾

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 microrganismos sugere inadequação da coleta (primeiro jato ou contaminação genital). Em relação à avaliação da bacteriúria, o achado de pelo menos uma célula bacteriana por campo de imersão corresponde, em mais de 95% das vezes, à cultura quantitativa da ordem de 100.000 colônias/mL. Cabe ressaltar, entretanto, que 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 em 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 à bacteriúria, o que permitirá orientar a terapêutica inicial, notadamente importante 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 - é definida pelo achado de uma amostra de urina positiva com contagem significativa (≥10⁶ UFC/mL) na ausência de sintomas, correlação que é válida para ambos os sexos.

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, as trompas de Falópio, os testículos e o epidídimo, habitualmente, não possuem microbiota estruturada, porém a vagina, a genitália externa e a uretra anterior possuem numerosa microbiota residente.

O Gram, em geral, permite o diagnóstico de uretrite e cervicite gonocócica, quando demonstra a presença de diplococos Gram-negativos intraleucocitários agrupados

em pares. Quando o Gram não demonstra a presença destes microrganismos intracelulares, o que ocorre mais comumente em mulheres, para excluir a etiologia gonocócica é necessário 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.⁽³⁸⁾

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*).

A doença inflamatória pélvica (DIP) corresponde à infecção aguda subclínica do trato genital feminino e é geralmente causada (>85%) por patógenos sexualmente transmitidos (principalmente a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Chlamydia trachomatis*) ou por patógenos causadores de vaginose bacteriana.⁽³⁹⁾ Menos frequentemente é causada por patógenos de origem entérica (*Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus agalactiae* e *Campylobacter* spp.) ou respiratória (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*) que colonizaram a vagina. A confirmação do diagnóstico de DIP pode ser feita a partir de cultura de material obtido do endométrio. O material, que é coletado por aspiração em seringa, deve ser enviado para a cultura em meios adequados, inclusive para anaeróbios.

No caso específico da tuberculose genital, que frequentemente envolve as trompas e o útero, a confirmação do diagnóstico é feita através de cultura, uma vez que o exame direto através do Ziehl-Neelsen pode detectar micobactérias saprófitas da microbiota residente urogenital, morfológicamente indistinguíveis do *Mycobacterium tuberculosis*.

Trato intestinal

Os intestinos possuem numerosa microbiota residente. 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.

As coproculturas são indicadas na investigação de diarreias nas quais se suspeite de etiologia bacteriana, principalmente as de natureza invasiva e passíveis de tratamento antibiótico (como na disenteria causada por *Shigella* sp.). Também podem ser 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.

A *Escherichia coli* é a bactéria aeróbica mais prevalente na microbiota habitual fecal. 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* entero-hemorrágica ou produtora de toxina Shiga (EHEC ou STEC), incluindo a *E. coli* O157:H7. O simples crescimento da *E. coli* em coprocultura não tem significado clínico, exceto quando caracterizada como patogênica, o que nem sempre é feito em laboratórios de rotina.

À medida que os métodos que não dependem de cultura se tornam cada vez mais disponíveis como recursos na investigação das doenças infecciosas, novas ferramentas de amplificação de ácidos nucleicos (simples ou múltiplos) passam a ser empregados também na abordagem diagnóstica dos quadros gastrointestinais. Usualmente, os métodos moleculares são mais sensíveis e possibilitam resultados mais rápidos que os de isolamento.^(40,41) Acresce ainda que os painéis multiplex, além de aumentarem a positividade de resultados, possibilitam detectar coinfeções. Ainda que sejam promissores, persistem restrições relativas ao alto custo e indefinição quanto à melhor estratégia no emprego rotineiro.

Cabe ainda ressaltar que, sobretudo, nos quadros diarreicos persistentes, a investigação diagnóstica deverá incluir métodos de pesquisa de cistos de protozoários e de ovos e larvas de helmintos. Neste cenário, devem ser consideradas as técnicas tradicionais de identificação de parasitos em amostra fecal (Faust, Lutz e Baermann-Moraes) e também a pesquisa de antígenos específicos.

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 significa, em geral, 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, com o objetivo de evitar contaminação pela microbiota residente do trajeto, permitindo a interpretação correta de um isolamento bacteriano. Bactérias como o *Staphylococcus epidermidis* e difteroides fazem parte da microbiota residente habitual da pele e podem ser contaminantes, porém 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 disso, 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, peritoneais, 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 semeadura 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 fundamentais na abordagem de casos graves (sepses e choque séptico). Dada a alta letalidade dessas condições, é crítica a identificação rápida e acurada do agente infeccioso presente na corrente sanguínea.⁽⁴²⁾ O advento dos métodos automatizados tornou possível a monitoração contínua do crescimento de microrganismos, usualmente baseado na detecção de dióxido de carbono produzido pelos microrganismos em crescimento. A automatização, além de simplificar o processamento das hemoculturas otimizando o trabalho no laboratório, reduziu o risco de contaminação que pode ocorrer durante o manuseio e encurtou o tempo necessário

para demonstrar crescimento no cultivo, registrando-se que 48 horas são suficientes para 70% a 80% das amostras positivas.

As hemoculturas são rotineiramente recomendadas na abordagem diagnóstica de síndromes com alto risco de presença de bacteremia, como é o caso das infecções endovasculares. Adicionalmente, devem ser coletadas ainda que no contexto de risco moderado, quando a cultura do foco primário não está disponível ou quando se faz necessária a introdução imediata de antibiótico.⁽⁴³⁾ Nas síndromes com baixa probabilidade de bacteremia, usualmente não se recomenda coletar hemoculturas, salvo quando acometem indivíduos com condições associadas a alto risco de complicações, como os portadores de próteses valvares ou marcapasso.

Descreve-se como “set” de hemocultura cada coleta de amostra realizada, que usualmente corresponde a um volume de sangue a ser dividido em dois frascos, de preferência um para aeróbios e outro para anaeróbio. É recomendável obter a cada set um volume adequado de sangue para inoculação em meio apropriado, em adultos geralmente 15mL a 20mL, sendo fundamental conhecer preliminarmente as orientações do fabricante do frasco para melhorar o rendimento do cultivo. É vantajoso coletar o maior volume na faixa recomendada, visto que para cada mL de sangue adicionado ocorre um aumento de 3% na taxa de isolamento.⁽⁴²⁾ Contudo, volumes de amostra superiores ao recomendado causam desproporcionalidade

entre amostra sanguínea e meio de cultura disponível, podendo, de forma inversa, prejudicar a recuperação de alguns microrganismos. O estabelecimento da relação ideal sangue/meio (usualmente 1/10 a 1/5) também leva em consideração a atividade bacteriostática do sangue conferida pela presença de leucócitos, lisozimas e complemento, e que exerce um papel antagônico ao crescimento bacteriano.

Uma vez inoculada a amostra de sangue, o frasco de hemocultura deverá ser mantido em temperatura ambiente (20°C 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 de hemocultura deverá permanecer em temperatura ambiente. Não se refrigera frasco de hemocultura inoculado, visto que a baixa temperatura inibe a multiplicação bacteriana.

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 vários *sets* (dois a três, em geral) com intervalo de minutos a algumas horas, dependendo da condição clínica do paciente. Nas emergências (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 usualmente presentes de forma contínua, o que facilita o isolamento. A coleta de dois *sets* de hemoculturas (cerca de 40mL de sangue) tem rendimento satisfatório, entretanto também neste contexto recomenda-se coleta de maior número de amostras (três ou quatro *sets*, total de 60mL a 80mL de sangue), tornando mais simples a discriminação entre patógeno verdadeiro e contaminante eventual, o que é particularmente crítico na presença de prótese ou enxerto, em que “contaminantes clássicos” (*Staphylococcus epidermidis*) podem estar etiologicamente envolvidos. A coleta de amostras múltiplas também aumenta a probabilidade de isolar microrganismos fastidiosos (grupo HACEK) que podem estar etiologicamente implicados em uma menor parcela de casos de endocardite.

A prática de obtenção do volume total de sangue em uma única amostra (30mL a 60mL em adultos) no intuito de simplificar (e tornar mais econômico) o hemocultivo pode conduzir a resultados de difícil interpretação,⁽⁴²⁾ visto que o isolamento em amostra única poderá não permitir uma interpretação segura do papel patogênico do agente isolado, particularmente quando o microrganismo faz parte da microbiota residente habitual da pele. Mais recentemente, um modelo alternativo para a coleta única preconiza desprezar o volume sanguíneo

inicial coletado, para minimizar o risco de contaminação com os constituintes da microbiota cutânea.^(44,45) A proposta apesar de atraente, requer sistema de coleta a vácuo nem sempre disponível.

Quando várias amostras são coletadas, é bem mais fácil perceber a ocorrência da contaminação. O crescimento bacteriano observado em geral se restringe a uma das amostras e a bactéria isolada não explica o contexto clínico. No entanto, independente do número de amostras, a interpretação do resultado do cultivo fica facilitada quando é possível presumir em bases clínico-epidemiológicas o provável agente etiológico envolvido, e o microrganismo isolado em cultivo corresponde ao previamente presumido.

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. 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.⁽⁴⁶⁾ Outros contaminantes reportados com relativa frequência são *Cutibacterium* spp. (antes, *Propionobacterium*), *Corynebacterium* spp., espécies do gênero *Bacillus* e, menos comumente, os *Streptococcus* do grupo *viridans*, *Enterococcus* spp. e *Clostridium* spp. Os laboratórios de microbiologia clínica devem monitorar rotineiramente a

taxa de contaminação de hemoculturas, gerando alertas para revisão de técnicas de coleta de amostras quando esta taxa for superior a 1%. O isolamento de bactérias como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroidaceae* geralmente tem significado clínico e deve ser valorizado. Interpretação semelhante se aplica às espécies fúngicas do gênero *Candida*.

O sangue para hemoculturas deve ser coletado exclusivamente através de punção venosa e, sempre que possível, em vasos dos membros superiores, no intuito de minimizar a possibilidade de contaminação durante o procedimento. Amostras coletadas a partir de acessos venosos estabelecidos (cateterismo, dissecação) são na maioria das vezes inadequadas em razão do elevado risco de contaminação (Quadro 4).

Quando a coleta de amostras é feita em vigência de antimicrobianos, deve ser priorizado o momento imediatamente anterior à administração da dose do fármaco. A equipe do laboratório deve ser informada e, sempre que disponível, 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*.

Cabe ainda ressaltar que a prática de aguardar o pico febril para coletar hemoculturas não é recomendável, dado ser o

momento de maior destruição microbiana, o que pode até dificultar a recuperação de organismos viáveis. Uma estratégia interessante é coletar a amostra tão logo constatado o progressivo aumento da temperatura corporal (início de episódio febril).

Em adultos, são utilizados, geralmente, de 15mL a 20mL por amostra coletada (“set”), volume que costuma ser dividido em dois frascos (7,5mL a 10mL de sangue por frasco, cada frasco contendo cerca de 40mL a 45mL de meio de cultura). O ideal é que a cada set sejam utilizados um frasco para aeróbios e o outro para anaeróbios, o último com composição específica que

facilita a recuperação de microrganismos anaeróbios e aumenta a probabilidade de recuperação antecipada de microrganismos microaerofílicos, inclusive *Streptococcus pneumoniae*. Contudo, se por limitação técnica eventual o volume total coletado numa determinada amostra for inferior ao preconizado por frasco, o maior volume de sangue deve ser inoculado no frasco aeróbio para que não haja perda na detecção de bacteremias causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou leveduras, que são aeróbios estritos. O menor volume restante deve ser inoculado no frasco anaeróbio.

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 luvas 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. Realizar a antisepsia local com solução de clorexidina alcoólica 2,0% e aguardar a secagem por 1 minuto. Aplicar o antisséptico com movimentos circulares (de dentro para fora) ou retos unidirecionais.
7. Após a antisepsia, não palpar a área da punção, ainda que em uso de luvas estéreis.
8. A venopuntura é geralmente realizada com seringa (de 20mL em adultos), tomando-se o cuidado de não tocar a agulha, nem a pele limpa.
9. O sangue deve ser injetado rapidamente (em até um minuto) no frasco (ou frascos) de cultura, sem troca de agulha, para evitar acidentes.
10. Descartar seringa e agulha (sem reencapar) em coletor apropriado de paredes rígidas e impermeáveis.

Repetir todos os 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 crianças, é possível manter o rendimento final do isolamento bacteriano com a coleta de dois *sets* (e não três) e de volumes menores por amostra.⁽⁴²⁾ O volume total coletado nas duas amostras deve ser de aproximadamente 1% do volume sanguíneo da criança estimado pelo peso corporal (cerca de 70mL/kg). Desta forma, uma criança com peso corporal de 10 kg, com volume sanguíneo estimado de 700mL, colherá duas amostras de 3,5mL. Preferencialmente, frascos de hemoculturas pediátricas (contendo até no máximo 20mL 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 à 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 coleta asséptica de uma amostra de sangue (3mL em adultos) em tubo com EDTA, que então é centrifugada a 1350 rpm durante 5 minutos. De forma geral, o método é bem menos sensível do que a hemocultura, uma vez que nas bacteremias a concentração de microrganismos 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 de Gram do creme leucocitário na rotina clínica. É importante ressaltar que não se solicita “Gram do sangue”, pois a coloração direta de uma gota 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 microrganismo quando comparado 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.⁽⁴⁷⁾ O diagnóstico oportuno e a intervenção terapêutica imediata são cruciais para reduzir a letalidade e sequelas. O ideal é que, sempre que possível, o LCR seja prontamente obtido. Contudo, a decisão de realizar ou não a punção lombar para análise do LCR deverá, obrigatoriamente, levar em consideração: 1. as contraindicações ao procedimento (Quadro 5), pelo risco potencial de herniação encefálica e óbito; 2. a viabilidade de realizar o procedimento rapidamente, para que não ocorra atraso no início do antimicrobiano.⁽⁴⁸⁾

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 medicamento, 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 estimado 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. A despeito da esperada redução de positividade da cultura, ainda será possível realizar o Gram, a pesquisa de antígenos e, notadamente mais sensíveis, os testes moleculares.⁽⁴⁹⁾ 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 suscetibilidade aos antimicrobianos.

O LCR em um indivíduo é renovado a cada 6 a 8 horas e o volume total depende da faixa etária (Quadro 6). Observadas as contraindicações, o LCR deve ser coletado

(em adulto, se possível, 4mL) e distribuído em tubos estéreis, para bioquímica (tubo 1), microbiologia (tubo 2), citologia (tubo 3) e testes moleculares (tubo 4). Dependendo dos exames a serem solicitados, pode ser desejável a coleta de um volume maior (10mL a 15mL 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.

Os tubos devem ser numerados na ordem sequencial da coleta e corretamente rotulados (nome do paciente, tipo de espécime, data e hora da coleta), 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.

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.⁽⁵⁰⁾ O resultado do cultivo do LCR não produz resultados imediatos, porém a realização de exames adicionais, como análise do aspecto, contagem de leucócitos, determinação de glicose e proteína, Gram e PCR, permite obter rapidamente informações potencialmente úteis para a condução inicial do caso.

Pleura e pericárdio

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 de 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 em cultivo destes microrganismos. O Gram é, como em todos os materiais provenientes de locais sem microbiota residente, essencial para a avaliação inicial de amostras obtidas destes locais.

Osteoarticular

A prevalência de infecção osteoarticular vem crescendo ao longo dos anos em decorrência do aumento da expectativa de vida e do uso crescente de implantes para fixação óssea e de próteses articulares. Além disso, a evolução das técnicas cirúrgicas tem permitido a abordagem de lesões e fraturas cada vez mais graves e complexas, mais suscetíveis a maior risco de infecção.

O diagnóstico de infecção osteoarticular nem sempre é simples e depende de um conjunto de achados clínicos-laboratoriais, incluindo provas de atividade inflamatória no sangue, celularidade do líquido articular, exames histopatológico e microbiológico de espécimes osteoarticulares.^(51,52)

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)

A identificação do agente etiológico e a determinação do perfil de sensibilidade são de particular importância nas infecções osteoarticulares, pois permitem o uso racional dos antibióticos em tratamentos que são prolongados e com altas doses de antibióticos. Portanto, a coleta de material para culturas deve seguir um protocolo padronizado, de forma a otimizar o rendimento das amostras coletadas.

Importante salientar que em todos os pacientes com febre associada a infecção osteoarticular, a coleta de hemocultura (2 sets) deve ser feita. Pacientes que apresentam derrame articular devem ser submetidos à artrocentese pré ou intraoperatória. O líquido articular deve ser inoculado em frasco contendo anticoagulante (EDTA) para realização de celularidade global e específica (1mL) e em frascos de hemocultura para aeróbios e anaeróbios (2mL a 5mL em cada frasco).⁽⁵³⁾ Adicionalmente, nos casos de infecção em articulação nativa, onde o inóculo bacteriano é maior, uma amostra de líquido articular deve ser encaminhada em frasco estéril para realização do Gram e cultura (1mL). Em casos de infecção crônica refratária com culturas negativas ou quando a história clínica e epidemiológica for compatível com micobacteriose ou doença fúngica sistêmica, culturas para micobactérias e fungos estão indicadas.

As culturas de fragmentos intraoperatórios podem identificar o agente etiológico em 60% a 80% dos casos. A principal

causa de culturas negativas é o uso prévio de antibióticos, que nos casos de infecção crônica devem ser interrompidos por no mínimo 14 dias antes da coleta de culturas. É recomendável que, para se atingir uma maior sensibilidade, o tempo de incubação das culturas para germes comuns de fragmentos osteoarticulares seja estendido por 7 a 14 dias.⁽⁵⁴⁾

No intraoperatório, devem ser coletados 5 a 6 fragmentos de tecidos, preferencialmente, que tenham aspecto suspeito de infecção. Cada fragmento deve ser coletado com um novo instrumental cirúrgico e acondicionado em frasco distinto contendo soro fisiológico (suficiente para umedecer a amostra) e encaminhado imediatamente para o laboratório para realização de culturas para germes comuns aeróbios e anaeróbios. Quando a previsão de tempo entre a coleta dos fragmentos e o início de processamento das amostras for acima de 2 horas, a viabilidade dos microrganismos pode ser comprometida, especialmente das bactérias anaeróbias. Nesse caso, uma alternativa é a inoculação de alguns fragmentos em meio de tioglicolato logo após a coleta, ainda no centro cirúrgico. Se houver indicação, o envio de fragmentos para culturas de micobactérias e fungos deve ser feito em frascos estéreis com soro fisiológico.

A coleta de uma única amostra intraoperatória pode confundir o diagnóstico e deve ser evitada, pois o isolamento de um agente potencialmente contaminante de culturas em uma única amostra não permite

distinguir entre contaminação e infecção. O uso de *swabs*, ainda que para coleta de espécimes intraoperatórios, não está recomendado, pois a pequena quantidade de material obtido resulta em um baixo rendimento das culturas⁽⁵⁵⁾

Nos casos de infecção associada a implantes ortopédicos, o material com melhor rendimento para isolamento bacteriano é a membrana peri-implante. Outros espécimes de interesse para estudo microbiológico são a cápsula articular, a neossinóvia, osso e partes moles. Coleções fechadas, como hematomas peroperatórios potencialmente infectados ou abscessos, devem ser coletados e inoculados em frasco de hemocultura. A coleta de material de feridas abertas ou fístulas não é recomendada, por serem espécimes contaminados com a microbiota da pele, não fornecendo, portanto, informação confiável a respeito da real etiologia microbiológica da infecção.

Os materiais de síntese (placas, parafusos) ou próteses removidas durante a cirurgia para tratamento da infecção podem ser submetidos à sonicação, que consiste no uso de ultrassom para desfazer o biofilme aderido aos implantes. Embora alguns estudos apontem para uma maior sensibilidade em culturas do líquido obtido por sonicação que as culturas convencionais, a depender da técnica empregada pode haver um maior risco de contaminação da amostra. O envio do material de síntese em recipiente rígido de polietileno, estéril, mostrou-se mais seguro que em saco plástico estéril.

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.

CONFIRMAÇÃO ETIOLÓGICA POR MÉTODOS DE DEMONSTRAÇÃO DIRETA DA PRESENÇA DO AGENTE

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 em casos de sepse, nem sempre é possível confirmar a etiologia rapidamente. A intervenção terapêutica preliminar, sempre que possível, deverá ser feita após coleta de amostras para diagnóstico microbiológico, e será baseada nos critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais disponíveis, para evitar que um retardo coloque a vida do paciente em risco. Os resultados obtidos dos exames microbiológicos realizados 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 pertinentes.

Métodos microscópicos

Historicamente, 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 microrganismos observadas à microscopia possibilitam

frequentemente o reconhecimento preliminar (Quadro 7), e por vezes até a identificação definitiva, do agente infeccioso.

Alguns microrganismos dotados de grande motilidade podem ser visualizados apenas com adição de *solução salina* ao material original, como o protozoário *Trichomonas vaginalis* em secreção vaginal. Outros, como o fungo *Paracoccidioides 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 microrganismos 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 microrganismo (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* utilizada na pesquisa de *Treponema pallidum* (sífilis).

Gram

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

que facilitava enormemente a visualização microscópica, permitindo 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. 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 8).

Quadro 7

Técnicas microscópicas comumente utilizadas em laboratórios de microbiologia clínica

Coloração ou Técnica	Espécimes	Principais microrganismos (ou células) identificados
Gram	Múltiplas amostras biológicas diretas e amostras de culturas	Bactérias em geral e fungos
Ziehl-Neelsen (BAAR)	Amostras respiratórias, fluidos e organismos cultivados	Micobactéria, microsporidia, <i>Cryptosporidium</i> , <i>Isospora</i>
Giemsa ou Wright	Sangue, líquido cefalorraquidiano	Protozoários (<i>Plasmodium</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp. etc.)
Nanquim (Tinta da Índia)	Líquido cefalorraquidiano	<i>Cryptococcus</i>
KOH	Escarro, secreção vaginal, raspado ungueal e cutâneo	<i>Paracoccidioides</i> e outros fungos
Salina	Secreção vaginal, fezes	Parasitas móveis, fungos
Tricromo	Fezes	Ovos e parasitas intestinais
Azul de metileno	Fezes	Células inflamatórias

Quadro 8

Gram: características morfotintoriais das principais bactérias de importância médica

Características morfotintoriais (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>	Foliculite, 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>Clostridium difficile</i>	Colite pseudomembranosa
	<i>Lysteria monocytogenes</i>	Meningite e sepse em neonatos, idosos e imunodeficientes
Cocos Gram-negativos	<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningite, meningococemia
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Uretrite, cervicite, DIP, gonococemia
Cocobacilos Gram-negativos	<i>Haemophilus influenzae</i> B	Meningite, pneumonia, epiglotite
Bacilos Gram-negativos	Enterobactérias*: · <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Yersinia</i> spp. · <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>Burkholderia</i> spp.	Infecções respiratórias em portadores de fibrose cística; Infecções primárias de corrente sanguínea associada a cateteres dialíticos;
	<i>Bacteroides</i> spp.	Abscessos (infecções por anaeróbios)
	<i>Bordetella</i> spp.	Coqueluche

*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 por alguns minutos em temperatura ambiente e proceder à coloração. Todo o procedimento não exige mais de 20 a 30 minutos.

A bacterioscopia pelo Gram permite identificar presuntivamente uma bactéria dentro de um contexto clínico, através de suas características morfotintoriais 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 microrganismo compatível com as características morfotintoriais observadas, o material biológico examinado e o contexto clínico (ver Quadro 8). 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) correspondeu 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 de 1.000 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL, e de até 97% quando a quantidade é superior a 100.000 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 e de cerca de 60%, nos casos em que o início da antibioticoterapia antecedeu a coleta de LCR.

No intuito de propiciar maior rendimento do Gram em líquidos corporais originalmente estéreis (cefalorraquidiano, pleural, pericárdico, peritoneal, 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 microrganismo demonstrado faz parte da microbiota, deve-se atentar para rigorosos critérios de representatividade da amostra e confiabilidade dos achados (Quadro 9).

À medida que o método de Gram possibilita avaliar a representatividade da amostra coletada, mostra-se de grande utilidade para a decisão da pertinência (ou não) de prosseguir o isolamento em cultivo (CAP). 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 não confiáveis. Nesta circunstância, o médico que solicitou o exame deve ser imediatamente informado da inadequação da amostra.

Durante o processamento da cultura, o método de 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. A exposição prolongada ao calor da chama durante a fixação pode causar distorção bacteriana e dificultar o reconhecimento de características morfológicas. Por outro lado, a descoloração excessiva ou uso prévio de antimicrobianos (por alteração da parede celular) podem “transformar” um Gram-positivo em Gram-negativo. Além disso, 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

Quadro 9

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	-----

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 de 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 à descoloração com a solução álcool-ácida e finaliza-se utilizando o azul de metileno como contraste. 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 microrganismos 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, o que tem relevância na investigação de casos suspeitos e no controle de resposta à terapêutica de casos previamente diagnosticados. A capacidade de detecção depende do inóculo presente na amostra, que geralmente é positiva quando presentes mais de 5.000 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, preferencialmente matinais, em dias consecutivos

ou, alternativamente, uma amostra de es-carro induzido. O procedimento tem rele-vância não apenas no diagnóstico inicial, mas também no controle terapêutico. 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, sobretudo 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. Segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 2021, foram registrados 139.112 casos autóctones de malária no país, sendo 17% de malária por *P. falciparum* (e malária mista), sendo os outros 83% de malária por *P. vivax* (e outras espécies).

A confirmação (ou a exclusão) labora-torial do diagnóstico de malária deve ser feita por um microscopista experiente, através do exame cuidadoso, de lâminas corretamente preparadas de sangue pe-riférico 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, extensamente utilizada em cam-po, torna possível o exame mais rápido de um volume 3 a 5 vezes maior de sangue, o que resulta uma sensibilidade maior que a distensão na identificação de espécies de *Plasmodium*. O 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 imunes*, em geral a confirmação do diagnóstico pode ser feita sem dificuldades. Nos *semi-imunes*, a detecção de parasitas, em geral presentes 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 labora-torial – ser destituída de crítica. Como em qualquer outro método laboratorial, podem ocorrer erros em razão da realização ina-dequada da técnica ou relacionados ao ob-servador. 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 ma-lária, e novas lâminas devem ser repetidas com intervalo de 6 e 12 horas ou menores,

ditados pela gravidade do quadro. Nestas circunstâncias, é prudente que o paciente, quando *não imune*, 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*. A despeito desse resultado, o médico não poderá cometer o mesmo equívoco que o técnico de laboratório, uma vez que malária grave deve ser sempre considerada e *tratada* como sendo causada pelo *P. falciparum* até que seja comprovado o contrário.

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 microbiano alvo em amostras clínicas. A relativa simplicidade dos métodos e a rapidez na obtenção de resultados (minutos) serviram de incentivo para o desenvolvimento e a disponibilização progressiva de diversas técnicas (aglutinação pelo látex, imunocromatografia, imunoensaio etc.) para detecção de antígenos de bactérias, fungos, vírus e protozoários (Quadro 10).

Na pandemia de Covid-19, o desenvolvimento, a validação e a disponibilização de testes rápidos antigênicos foram fundamentais para acelerar o controle da pandemia, visto que a técnica padrão molecular nem sempre estava disponível para ser utilizada

em larga escala. Os testes rápidos antigênicos, ao viabilizar diagnóstico precoce da infecção do SARS-CoV-2 no ponto de atendimento, permitem definir rapidamente as medidas pertinentes para reduzir a transmissão, como isolamento de casos e rastreamento de contactantes.

Métodos de caracterização molecular

O notável avanço da engenharia genética nos últimos 30 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 destas técnicas, identificar "sinais" da presença de agente infeccioso em materiais biológicos que nem sempre dependem de sua viabilidade, o que pode resultar em maior capacidade de detecção do que os métodos convencionais.⁽⁵⁶⁾

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*), descrita por Saiki et al. (1985). A PCR amplifica pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de sequências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências,

tornando possível a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas.

As técnicas moleculares estão se tornando progressivamente menos complexas e os custos tendem a se reduzirem, o que facilita

a incorporação 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 de forma

Quadro 10

Uso clínico de pesquisa de antígenos específicos por técnicas imunológicas

Doença ou condição	Material	Exame para detecção de antígenos
Dengue	Sangue e soro	Pesquisa de antígeno NS1
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.
Malária	Soro	Pesquisa de antígenos maláricos (HRP-II e pLDH de <i>P. falciparum</i> e pLDH de <i>P. vivax</i>)
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
SARS-CoV-2	Secreção nasofaríngea e nasal média, saliva	Pesquisa de antígeno (nucleoproteína) por imunoensaio
Viroses respiratórias em geral	Secreção nasofaríngea	Pesquisa de influenza A e B, parainfluenza, adenovírus e VSR* por imunoensaio.

* Vírus sincicial respiratório.

generalizada, uma vez que é geralmente através do isolamento do agente que se determina a suscetibilidade aos antimicrobianos. A PCR já está disponível para detecção molecular de numerosos microrganismos e, de forma mais limitada, porém crescente, para detecção da presença de genes de resistência aos antimicrobianos. No contexto das doenças virais, a PCR é comumente o

método padrão de diagnóstico da fase inicial de acometimento, tal como vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico da infecção aguda pelo SARS-CoV-2, influenza, arbovírus, entre outros. De forma geral, em indivíduos sintomáticos, a sensibilidade da PCR é maior imediatamente antes (24 a 48 horas) do aparecimento, e durante os primeiros dias (3 a 5 dias) de sintomas.

Quadro 11

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

Doença ou condição	Material
Arboviroses: chikungunya, dengue, febre amarela, Oropoche, Zika	Soro de uma forma geral Urina, LCR.
Ebola	Sangue total (EDTA)
Enteroviroses	Soro, LCR, secreção nasofaríngea, fezes
Febre maculosa	Soro
Gripe, Covid-19 e outros patógenos respiratórios	Secreção nasofaríngea e nasal; lavado broncoalveolar
Hepatites A, B, C, D	Soro
Infecção primária pelo HIV e seguimento	Soro
Infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i> (uretrite, colpíte, DIP)	Raspado uretral ou do colo uterino
Infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (uretrite, colpíte, DIP, faringite)	Raspado uretral ou do colo uterino, <i>swab</i> de orofaringe
Leptospirose	Soro. Urina
Meningococemia e meningites bacterianas	Soro. LCR. Raspado/aspirado de lesão cutânea.
Meningoencefalites virais e bacterianas	LCR
Pneumonias bacterianas em geral e atípicas	Escarro
Toxoplasmose congênita	Líquido amniótico
Tuberculose (pulmonar, meníngea)	Escarro, LCR
Varicela e zóster	Aspirado de vesícula
Variola do macaco (mpox)	<i>Swab</i> de lesão cutânea (úmida), crosta de ferida, <i>swab</i> de orofaringe, sangue

Para superar a desvantagem inerente do custo da PCR e melhorar a capacidade diagnóstica em contextos sindrômicos, foi desenvolvida uma variante da PCR, chamada PCR multiplex, que permite a detecção simultânea de múltiplos alvos em uma única reação. A PCR multiplex tem maior abrangência de diagnóstico, menor tempo e custo quando comparada a realização de diferentes testes moleculares individuais concomitantes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88949/>).

Diversos painéis de PCR multiplex estão cada vez mais disponíveis em laboratórios clínicos, embora com custo ainda elevado. Estes painéis geralmente incluem os microrganismos mais comumente associados a um diagnóstico sindrômico, como sepses, meningite/encefalite, infecção respiratória, infecção articular e diarreia.^(57,58)

Tecnologia molecular no cenário *point-of-care*

A utilização de técnicas moleculares rápidas visando o diagnóstico imediato da etiologia de um processo infeccioso no ponto de cuidado é relativamente recente, como ilustrado pela inclusão de testes rápidos de diagnóstico de tuberculose. Contudo, ainda que não amplamente disponíveis, os testes moleculares rápidos representam ferramentas estratégicas para otimização do cuidado na atenção primária, o que justifica o crescente interesse e investimento no desenvolvimento de testes moleculares

simples. A perspectiva é de que os desafios operacionais sejam resolvidos e os custos reduzam, possibilitando a progressiva aplicação desses recursos na atenção primária. Ainda mais promissora é a possibilidade de tornar factível a abordagem diagnóstica molecular conjunta de múltiplos agentes de síndromes comuns.

Sequenciamento de nova geração

Diferentes tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *new generation sequencing*) foram disponibilizadas para uso clínico, como o sequenciamento do genoma completo, o sequenciamento direcionado (target – tNGS) e a metagenômica (mNGS).

Sequenciamento do genoma completo

No sequenciamento do genoma completo (WGS, do inglês *whole-genome sequencing*), milhões de fragmentos de DNA microbiano são lidos em paralelo. Em sequência, estas leituras são agrupadas de forma a reconstruir o genoma microbiano, possibilitando a identificação do patógeno. A técnica do WGS tem se revelado uma ferramenta valiosa e acurada na investigação e prevenção de surtos hospitalares, viabilizando a identificação precoce de um surto em potencial. Adicionalmente, abre novas perspectivas para o rastreamento de determinantes genéticos de resistência antimicrobiana.⁽⁵⁹⁾

Sequenciamento direcionado

No sequenciamento direcionado (tNGS, do inglês *target next-generation sequencing*), o alvo de interesse, usualmente um gene comum a vários microrganismos (tal como o gene 16S rRNA), é amplificado diretamente do espécime clínico.⁽⁶⁰⁾ Em sequência, os produtos amplificados são sequenciados, possibilitando a detecção e identificação da composição do microrganismo em foco. Plataformas genômicas de referência servem de base para análise comparativa e interpretação.

Metagenômica (mGNS)

A metagenômica é uma abordagem de sequenciamento genético imparcial que usa tecnologia de alto rendimento para sequenciar bilhões de fragmentos de ácido nucleico simultaneamente. Ao contrário dos métodos tradicionais de PCR que requerem *primers* específicos, a metagenômica é um método de sequenciamento que não depende de hipóteses diagnósticas para direcionar a identificação do patógeno. Entretanto, é necessária uma análise de bioinformática para subtrair o DNA do hospedeiro, a fim de identificar os ácidos nucleicos microbianos, combinando leituras de DNA e RNA com bibliotecas genéticas de todos os microrganismos conhecidos, incluindo bactérias, vírus DNA e RNA, fungos e parasitas.⁽⁶¹⁾

A metagenômica tem aberto novas perspectivas para o esclarecimento da etiologia das doenças infecciosas. Pode ser

extremamente útil no contexto da investigação diagnóstica com múltiplas possibilidades etiológicas, no cenário de emergência de um novo patógeno e na identificação de microrganismos de difícil cultivo. A utilização da metagenômica na prática clínica ainda é restrita e de custo elevado, mas a tendência é que progressivamente se torne mais disponível e de custo mais acessível.

Confirmação diagnóstica através de 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 microrganismo 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 viabilizar a determinação subsequente da suscetibilidade do microrganismo aos antimicrobianos.

Para a maioria das bactérias de importância médica, asseguradas as 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 5 dias), dependendo da amostra processada e do agente infeccioso presumido. Para microrganismos 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.

O crescimento dos microrganismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a sua identificação. É importante conhecer o potencial de crescimento em cada meio de cultura e adequar ao perfil bacteriano esperado para cada material (Quadro 12).

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 microrganismos estão sendo progressivamente disponibilizados, destacando-se a espectrometria de massa, que 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

Quadro 12

Crescimento dos microrganismos nos principais meios de cultura utilizados na rotina

Microrganismos	Ágar Sangue	Ágar Chocolate	TIO (Caldo)	CLED	Salm-Shigella	Mac Conkey
Gram-positivo	+	+	+	+	-	-
Gram-negativo, enterococo e leveduras	+	+	+	+	-/+	-/+
Gram-negativos exigentes	+	+	-	-	-	-
<i>Haemophilus</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Salmonella-Shigella</i>	-	-	-	-	+	-
Anaeróbios	-	-	+	-	-	-

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 computadorizados. Essa técnica permite diagnósticos microbiológicos complexos em minutos como, por exemplo, a especiação dos estafilococos coagulase negativos ou a definição dos vários sorovariantes da *Salmonella enterica*.

Métodos de avaliação da suscetibilidade 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 microrganismo é considerado sensível ou resistente a um determinado fármaco em função de sua capacidade de desenvolver-se *in vitro*, em presença de concentração habitualmente obtida pelo fármaco *in vivo*, na terapêutica das infecções.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), ou antibiograma, permite determinar *in vitro* a suscetibilidade de microrganismos aos fármacos, tornando possível o seu emprego clínico com razoável grau de certeza quanto à resposta terapêutica. São utilizados dois métodos básicos para a realização do TSA, o de difusão e o de diluição.

A confiabilidade dos TSA convencionais 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. No Brasil, desde 2018, conforme definição em portaria do Ministério da Saúde (Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018), os documentos da versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST / versão BrCAST) passaram a ser referência obrigatória para interpretação dos TSA e podem ser consultados gratuitamente online (<https://brcast.org.br/documentos/>).

A seleção dos medicamentos a serem empregados nos TSA é determinada pela utilidade na terapêutica das infecções causadas pelo agente a ser testado e o sítio onde o fármaco deverá atuar. É usual 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.

É admissível, no entanto, que se teste um fármaco que não necessariamente será empregado 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 na vigilância do aparecimento e disseminação de resistência.

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 microrganismo 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 o fármaco testado. A CIM estabelecida pelo limite do halo não é quantificada diretamente em $\mu\text{g/mL}$. 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 microrganismo testado.

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 o 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 de 35°C por 20 a 24 horas.

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: “suscetível” (ou “sensível”), “intermediária” e “resistente”.

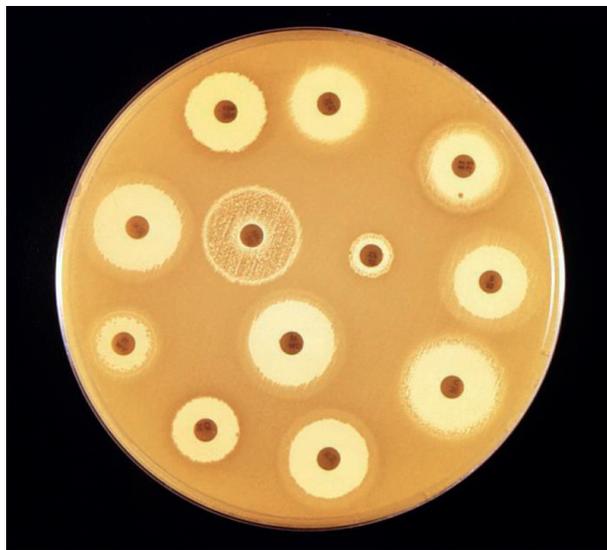


Figura 1

Difusão em ágar: técnica de Kirby-Bauer

Fonte: Public Health Image Library - CDC, 2013.

O estabelecimento destas categorias baseia-se na comparação do diâmetro da zona de inibição observada no TSA com tabelas padronizadas. Naturalmente que na seleção do antimicrobiano deve ser levada em consideração a farmacocinética do medicamento, 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.

Métodos dilucionais

Os métodos dilucionais para aferição da suscetibilidade aos antimicrobianos são quantitativos, sendo utilizados para a determinação da menor concentração do antimicrobiano (expressa em mg/mL) necessária para a inibição do crescimento bacteriano (CIM, concentração inibitória mínima). 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 concentração bactericida mínima (CBM), definida como a menor concentração do antimicrobiano que é letal para pelo menos 99,9% do inóculo original. 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 microrganismo nos tubos ou nas unidades das placas de microdiluição. Em geral, a categoria sensível é definida por CIM igual ou abaixo de 1/4 da concentração sérica máxima do medicamento 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 suscetíveis. A categoria resistente inclui microrganismos que não são inibidos com as concentrações sistêmicas do medicamento, obtidas nos esquemas terapêuticos usuais.

Vários sistemas foram desenvolvidos que oferecem diferentes níveis de automatização para agilizar a identificação do crescimento de microrganismos e a determinação da suscetibilidade 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 13 e 14).

Quadro 13

Identificação e antibiograma automatizados: bactéria Gram-negativa.

TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS: Identificação e antibiograma (CIM) automatizados Material clínico: Urina (segundo jato) Germe isolado: <i>Escherichia coli</i>		
Antibiótico		CIM($\mu\text{g/mL}$)
Amicacina	Sensível	≤ 8
Amoxicilina/Ac. Clavulânico	Sensível	≤ 8
Ampicilina	Resistente	> 8
Aztreonam	Sensível	≤ 1
Cefalexina	Resistente	> 8
Cefepima	Sensível	≤ 1
Ceftazidima	Sensível	≤ 1
Ceftriaxone	Sensível	≤ 1
Cefuroxima	Sensível	≤ 4
Ciprofloxacina	Sensível	$\leq 0,25$
Ertapeném	Sensível	$\leq 0,5$
Fosfomicina	Sensível	≤ 8
Gentamicina	Sensível	≤ 2
Imipeném	Sensível	≤ 1
Levofloxacina	Sensível	≤ 1
Meropeném	Sensível	≤ 1
Nitrofurantoína	Sensível	≤ 32
Norfloxacina	Sensível	$\leq 0,5$
Piperacilina/Tazobactam	Sensível	≤ 8
Sulfametoxazol/Trimetoprima*	Sensível	≤ 2
Tetraciclina	Sensível	≤ 4
Tigeciclina	Sensível	$\leq 0,5$

*Avaliado pelo componente trimetoprima

Quadro 14

Identificação e antibiograma automatizados: bactéria Gram-positiva.

TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS Identificação e antibiograma (CIM) automatizados Material clínico: Pus de abscesso Germe isolado: <i>Staphylococcus aureus</i>		
Antibiótico		CIM($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina-sulbactam	Sensível	≤ 2
Cefalotina	Sensível	≤ 2
Ciprofloxacina	Resistente	≥ 2
Clindamicina	Sensível	$\leq 0,5$
Eritromicina	Sensível	$\leq 0,5$
Gentamicina	Sensível	≤ 2
Linezolida	Sensível	$\leq 0,5$
Moxifloxacina	Sensível	$\leq 0,25$
Oxacilina	Sensível	$= 0,5$
Penicilina G	Resistente	≥ 16
Sulfametoxazol/trimetoprima*	Sensível	$\leq 1,0$
Tetraciclina	Resistente	≥ 8
Vancomicina	Sensível	$= 1$

*Avaliado pelo componente trimetoprima

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 à 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

e resinas que inativam os antibióticos que porventura estejam sendo veiculados na corrente sanguínea do 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 disso, a utilização de painéis padronizados de antimicrobianos, de certa forma, diminui a flexibilidade, por vezes desejável, da escolha do antimicrobiano a ser testado.

Teste E

O Etest® (Epsilon meter test - AB BIO-DISK®) 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 5mm de largura e 50mm de comprimento, que possui um gradiente exponencial predefinido e estável do antimicrobiano a ser testado (Figura 2).

Um dos lados da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em µg/mL e um código de duas letras que identifica o antibiótico testado. A fita é aplicada

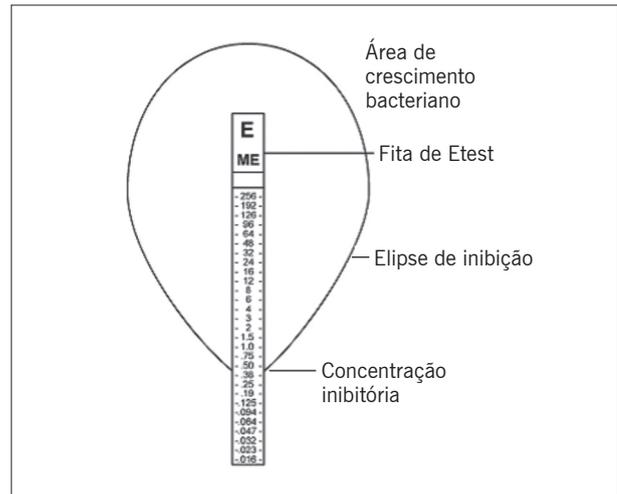


Figura 2
Epsilon meter test

sobre ágar previamente inoculado com o microrganismo 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® se mostra particularmente útil para a determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias exigentes e anaeróbios, para os quais os sistemas automatizados revelam-se inadequados.

Interpretação do antibiograma

De acordo com os novos conceitos de interpretação do TSA pelo EUCAST/BrCast, um microrganismo é definido como sensível (S = Sensível Dose Padrão) quando há alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando um regime de dosagem padrão do antimicrobiano; intermediário (I = Sensível

Aumentando Exposição) quando há elevada probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição ao antimicrobiano é aumentada pelo ajuste do regime de dosagem ou por aumento da sua concentração no local da infecção; resistente (R = Resistente) quando há uma alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há maior exposição. É importante considerar que os limites que definem as categorias de suscetibilidade 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 suscetibilidade. 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 fármacos deve ser adequado, não devendo ser testados antimicrobianos que sabidamente não têm ação (ou que não possam ser úteis para avaliação mais precisa da resistência) contra o microrganismo em questão e os que não podem ser empregados na situação clínica em questão. Assim, além de revelar uma falha técnica, é irrelevante o registro da resistência de um Gram-positivo à polimixina ou de um Gram-negativo à

eritromicina, uma vez que para ambos isso é um fato conhecido (resistência constitutiva). Da mesma forma é destituído de sentido anotar a sensibilidade à nitrofurantoína para uma bactéria que seja a causa de meningite, uma vez que este fármaco 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 enterobactérias (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 fármacos pertencentes a grupos em que ocorre resistência cruzada devem ser uniformes. Assim, não seria coerente que um microrganismo 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 microrganismo.

É importante salientar que na escolha do antibiótico dentre os quais a bactéria é sensível, não se justifica comparar a CIM entre fármacos de classes diferentes. Assim, se através da cultura e TSA da urina for demonstrado que a bactéria causadora de uma cistite é sensível ao cotrimoxazol e à ciprofloxacina, ambos disponíveis por via oral, deve-se dar preferência ao cotrimoxazol, ainda que a CIM em valor absoluto seja menor para a ciprofloxacina. Neste contexto, em que se admite o sucesso terapêutico com ambos os medicamentos, a escolha mais adequada será por aquele com menor espectro, toxicidade e custo.

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.⁽⁶²⁾

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 15). As mais utilizadas em laboratórios clínicos, em decorrência da simplicidade técnica e custo proporcionalmente menor, são o ELISA, o MEIA e a quimioluminescência.

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 de doenças causadas por vírus e por 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, em geral desaparecendo de 3 a 6 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

Quadro 15

Sorologias frequentemente utilizadas na investigação de síndrome de mononucleose

Doença ou condição	Exames para detecção de anticorpos
Mononucleose infecciosa (Epstein-Barr)	Pesquisa de anticorpos heterofilicos (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).

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 a imunidade (ou suscetibilidade) para determinado agente e o de investigar a etiologia de um processo infeccioso agudo. No primeiro contexto, geralmente se utiliza uma amostra de soro para a determinação qualitativa da presença de anticorpo protetor (IgG). Essa informação pode ser útil para comprovar imunidade prévia para 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 coletadas em momentos diferentes (amostras pareadas com intervalo de 10 a 14 dias), correspondentes à 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 não é 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 imunidade conferida por infecção antiga, ou ainda por vacinação específica.

Notadamente, o aprimoramento das técnicas imunossorológicas tornou possível detectar a presença de IgM por um período 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 reinfecção ou reativação de processos infecciosos.

De emprego mais recente, um método de ensaio imunoenzimático com base na capacidade de ligação dos anticorpos IgG permite 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 3 meses de evolução, a IgG apresenta baixa avidéz, enquanto em infecções com mais de 3 meses, os anticorpos apresentam alta avidéz. O teste de avidéz tem pouca aplicação como recurso preferencial para o diagnóstico dos quadros infecciosos agudos em geral, não se justificando seu emprego 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.

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 a 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 determinada condição em todos os indivíduos testados.

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

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

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 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.

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

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

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 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 procurar diminuir a probabilidade pré-teste. Assim, por exemplo, a solicitação de exames confirmatórios para malária em todas as pessoas que apresentem febre e que residam na cidade do Rio de Janeiro (uma área não endêmica) resultará (além do desperdício de recursos) em testes que detectam 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 disso, 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 (relativamente comum) de oferecer aos doadores resultados dos testes de triagem como "recompensa" para a doação 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 aumento da 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os desafios emergentes de um ambiente em rápida e constante mudança, os avanços conceituais na nossa compreensão da virulência microbiana e o desenvolvimento revolucionário de ferramentas técnicas de investigação diagnóstica apontam para variados cenários e estratégias futuras. Caminhamos para a identificação e caracterização rápida

de patógenos diretamente de amostras clínicas e hospedeiros infectados, utilizando abordagens independentes do isolamento em cultivo. A manipulação e a caracterização de todo o genoma de células bacterianas individuais e a identificação de patógenos baseada em sequenciamento profundo a partir de amostras clínicas já são realidades. Progressivamente somos capazes de medir a abundância de transcritos microbianos e a atividade metabólica em todo o genoma diretamente de espécimes humanos também. Adicionalmente, a composição e a função das comunidades microbianas podem ser avaliadas utilizando tecnologias de metagenômica e pós-genômica. Paralelamente, cada vez mais passamos a compreender a importância da variação genética do hospedeiro na suscetibilidade diferencial à infecção e a doenças subsequentes. Ademais, as tecnologias genômicas e pós-genômicas nos permitem medir e interpretar padrões de expressão gênica e proteica humana associados com a resposta a doenças infecciosas.

Por fim, é fundamental compreender que, a despeito de todo avanço tecnológico, é necessário preservar a racionalidade e utilizar de forma oportuna e inteligente as novas tecnologias diagnósticas em harmonia com os valiosos recursos da microbiologia clássica. Igualmente relevante: é imperativo assegurar a interpretação cuidadosa de resultados de testes em diferentes cenários clínicos, de forma a efetivamente otimizar o cuidado ao paciente.

REFERÊNCIAS

1. Chew K, Chia JWZ, Vasoo S. Diagnostic stewardship in Clinical Microbiology. In: Carrol KC, Pfaller MA, Karlowky JA CARROL KC, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Pritt BS (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 13rd ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2023. ISBN: 9781683674290.
2. White AT, Vaughn VM, Petty LA, et al. Development of Patient Safety Measures to Identify Inappropriate Diagnosis of Common Infections, *Clinical Infectious Diseases*, 2024; 78 (6), 1403–1411, <https://doi.org/10.1093/cid/ciae044>.
3. Miller J, Binnicker M, Campbell S, et al. Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2024 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM), *Clinical Infectious Diseases*, 2024; *ciae104*, <https://doi.org/10.1093/cid/ciae104>.
4. Aagaard K, Ann Luna R & Versalovic J. The Human Microbiome of Local Body Sites and Their Unique Biology. In: Bennett JE, Dolin R & Blaser MJ. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed. New York, Churchill Livingstone, 2020. 2v. ISBN: 9780323482554.
5. Rao MV, Messina JA, Surana NK. The Human Microbiome. In: Carrol KC, Pfaller MA, Karlowky JA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Pritt BS (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 13rd ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2023 (ISBN: 9781683674290).
6. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, et al. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med*, 2018; 24(4): 392-400, <https://doi.org/10.1038/nm.4517>.
7. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 2016; 164:337–340, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
8. Chu DM, Ma J, Prince AL, et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med*. 2017; 23:314–326, <https://doi.org/10.1038/nm.4272>
9. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 11971–11975, <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>.
10. Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):690-703, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>.
11. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 2017; 550(7674):61-66, <https://doi.org/10.1038/nature23889>.
12. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009; 326:1694–1697, <https://doi.org/10.1126/science.1177486>.
13. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, et al. Structure, function, and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486:207–214, <https://doi.org/10.1038/nature11234>.
14. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006;124(4):715-27, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>.
15. Relman DA, Falkow S, Ramakrishnan L. A Molecular Perspective of Microbial Pathogenicity In: Bennett JE, Dolin R & Blaser, MJ. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed. New York, Churchill Livingstone, 2020. 2v.
16. Medzhitov R. Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity. *J Immunol*. 2013; 191(9):4473–4, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302427>.
17. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(1):1-3, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.01.008>.
18. Bowen A, Wear M, Casadevall A. Antibody-mediated catalysis in infection and immunity. *Infect Immun*. 2017; 85, <https://doi.org/10.1128/IAI.00202-17>.

19. Birdsall HH, Cesadevall A. Adaptive immunity: Antibodies and Immunodeficiencies. In: Bennett JE, Dolin R. & Blaser MJ. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. New York, Churchill Livingstone, 2020. 2v. ISBN: 9780323482554.
20. Lionakis MS, Hohl TM. Cell-Mediated Defense Against Infection. In: Bennett JE; Dolin R. & Blaser MJ. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. New York, Churchill Livingstone, 2020. 2v. ISBN: 9780323482554.
21. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2022. Principles and Procedures for Blood Cultures, 2nd Edition. CLSI Guideline M47. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
22. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018 Aug 31;67(6):e1-e94, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>.
23. Mcelvania E, Singh K. Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. In: Carrol KC, Pfaller MA, Karlowsky JA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Pritt BS (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 13rd ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2023 (ISBN: 9781683674290).
24. Wong AYW, Johnsson ATA, Iversen A, et al. Evaluation of Four Lateral Flow Assays for the Detection of Legionella Urinary Antigen. *Microorganisms*. 2021 Feb 26;9(3):493, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030493>.
25. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(2):147-59, <https://doi.org/10.1093/cid/ciu296>.
26. Montravers P, Snauwaert A, Welsch C. Current guidelines and recommendations for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29(2): 131-8, <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000242>.
27. Esposito S, Pagliano P, De Simone G et al. Epidemiology, aetiology and treatment of skin and soft tissue infections: final report of a prospective multicentre national registry, *Journal of Chemotherapy* 2022, 34:8, 524-533, <https://doi.org/10.1080/1120009X.2022.2075170>.
28. Anjos LM, Marcondes MB, Lima MF, Mondelli AL, Okoshi MP. Streptococcal acute pharyngitis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47(4):409e13, <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0265-2013>.
29. Kanagasabai A, Evans C, Jones HE et al. Systematic review and meta-analysis of the accuracy of McIsaac and Centor score in patients presenting to secondary care with pharyngitis. *Clin Microbiol Infect*. 2024; 30(4):445-452, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.12.025>
30. Cohen DM, Russo ME, Jaggi P, Kline J, Gluckman W, Parekh A. Multicenter Clinical Evaluation of the Novel Alere i Strep A Isothermal Nucleic Acid Amplification Test. *J Clin Microbiol* 2015; 53(7): 2258-61, <https://doi.org/10.1128/JCM.00490-15>.
31. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. *mBio*. 2017; 8(1):e02287-16, <https://doi.org/10.1128/mBio.02287-16>.
32. Metlay JP, Waterer GW, Long AC et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Volume 200, Issue 7, 1 October 2019, Pages e45-e67, <https://doi.org/10.1164/rccm.201908-1581ST>.
33. Shoar S, Musher DM. Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review. *Pneumonia (Nathan)*. 2020; 12:11, <https://doi.org/10.1186/s41479-020-00074-3>.
34. Chai TC, Wolfe AJ Brubaker L. The Urinary Microbiome Improving Diagnostics and Management of Urinary Tract Infections in Adult Females. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2024. 241-253 <https://doi.org/10.1016/j.idc.2024.03.003>.
35. Foxman, B. Urinary Tract Infection Syndromes. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2014. 28(1):1-13, <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>.

36. Larocco M, Franek J, Leibach EK, Weissfeld AS, et al. Effectiveness of Preanalytic Practices on Contamination and Diagnostic Accuracy of Urine Cultures: A Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Microbiol Rev*, 2016; 29 (1), <https://doi.org/10.1128/cmr.00030-15>.
37. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, et al. Infectious Diseases Society of America. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2010;50(5):625-63, <https://doi.org/10.1086/650482>.
38. Ross J, Guaschino S, Cusini M, Jensen J. 2017 European guideline for the management of pelvic inflammatory disease. *Int J STD AIDS* 2018; 29:108. <https://doi.org/10.1177/0956462417744099>
39. Brunham RC, Gottlieb SL, Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med* 2015; 372:2039. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1411426>.
40. Binnicker MJ. Multiplex Molecular Panels for Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation, and Cost-Effectiveness. *J Clin Microbiol* 2015; 53. <https://doi.org/10.1128/jcm.02103-15>.
41. Arbefeville S., Ferrieri P. Role of Multiplex Molecular Diagnosis for Acute Gastroenteritis. *Curr Infect Dis Rep*, 2020. 22, 9. <https://doi.org/10.1007/s11908-020-0718-1>.
42. Harrington AT, Jean S, Hilt EE. Laboratory Detection of Bacteremia and Fungemia. In: Carrol KC, Pfaller MA, Karlowky JA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Pritt BS (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 13rd ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2023. ISBN: 9781683674290.
43. Fabre V, Sharara SL, Salinas AB, Carroll KC, Desai S, Cosgrove SE. Does This Patient Need Blood Cultures? A Scoping Review of Indications for Blood Cultures in Adult Nonneutropenic Inpatients. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(5):1339-1347, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa039>.
44. Rupp ME, Cavalieri RJ, Marolf C, Lyden E. Reduction in blood culture contamination through use of initial specimen diversion device. *Clin Infect Dis* 2017; 65: 205-205, <https://doi.org/10.1093/cid/cix304>.
45. Zimmerman FS, Karamed H, Ben-Chetrit E, Zalut T, Assous M, Levin PD. Modification of blood test draw order to reduce blood culture contamination: a randomized clinical trial. *Clin Infect Dis* 71: 1215-1220, <https://doi.org/10.1093/cid/ciz971>.
46. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:870, <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
47. Ramasamy R, Willis L, Kadambari S, et al. Management of suspected paediatric meningitis: a multicentre prospective cohort study. *Arch Dis Child*. 2018 Dec;103(12):1114-1118, <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-313913>.
48. Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, Van de Beek D. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. *Lancet*. 2012 Nov 10;380(9854):1684-92, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61185-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61185-4).
49. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, et al. São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(6):e20675, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020675>.
50. Castillo, Dana et al. "Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* : WHO manual. 2nd ed.", 2011.
51. Metsemakers WJ, Morgenstern M, McNally MA, et al. Fracture-related infection: A consensus on definition from an international expert group. *Injury* 2018;49:505-10, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.08.040>.
52. Sigmund IK, Luger M, Windhager R, McNally MA. Diagnosing periprosthetic joint infections. *Bone Joint Res* 2022; 11:608-18. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.119.BJR-2022-0078.R1>.
53. Infections of the musculoskeletal system: basic principles, prevention, diagnosis and treatment. 1st edition. Grandvaux: Swiss orthopaedics in-house-publisher; 2014.
54. Lima ALLM, Oliveira PRD, Carvalho VC de. Infecções ortopédicas: abordagem multidisciplinar. ATHENEU; 2013.

55. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:302–45, <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-13>.
 56. Parikh BA, Hughes AEO, Anderson NW. Molecular Techniques In: Carrol KC, Pfaller MA, Karlowsky JA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Pritt BS (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 13rd ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2023. ISBN: 9781683674290.
 57. Dien Bard J, Mcelvania E. (2020). Panels and syndromic testing in clinical microbiology. *Clin. Lab. Med*, 2020; 40(4): 393–420, <https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.08.001>.
 58. Chiu CY, Miller SA. “Clinical Metagenomics”. *Nature Reviews Genetics*, 2019; 20 (6): 341–55, <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>.
 59. Rodino, KG, Simner, PJ. Status check: next-generation sequencing for infectious-disease diagnostics. *J Clin Invest*, 2024; 134(4):e178003. <https://doi.org/10.1172/JCI178003>.
 60. Gaston DC, Miller HB, Fissel JA, et al. Evaluation of Metagenomic and Targeted Next-Generation Sequencing Workflows for Detection of Respiratory Pathogens from Bronchoalveolar Lavage Fluid Specimens. *J Clin Microbiol*, 2022; 60:e00526-22, <https://doi.org/10.1128/jcm.00526-22>.
 61. Graff K, Dominguez SR, E Messacar K. “Metagenomic Next-Generation Sequencing for Diagnosis of Pediatric Meningitis and Encephalitis: A Review”. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2021; 10 (Supplement_4): S78–87, <https://doi.org/10.1093/jpids/piab067>.
 62. Theel ES. Immunoassays for the Diagnosis of Infectious Diseases. In: Carrol KC, Pfaller MA, Karlowsky JA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Pritt BS (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 13rd ed. American Society of Clinical Microbiology, Washington, 2023. ISBN: 9781683674290.
-