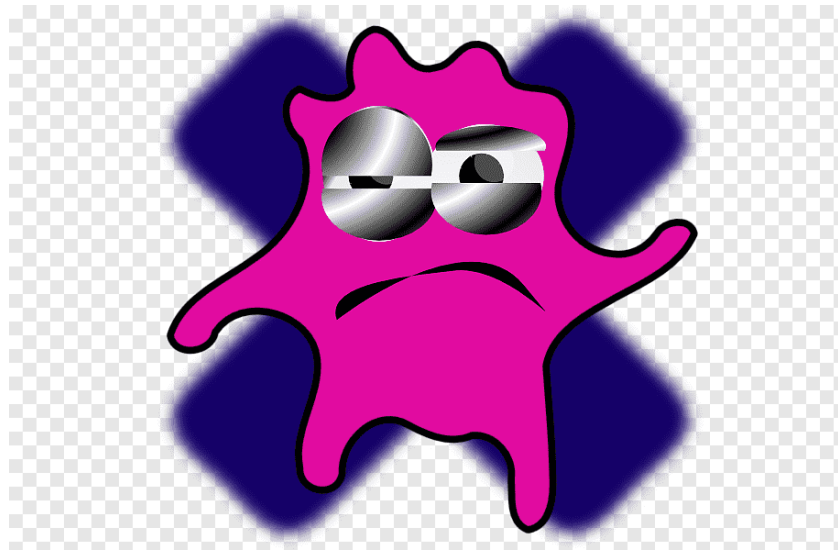


Introdução ao diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas

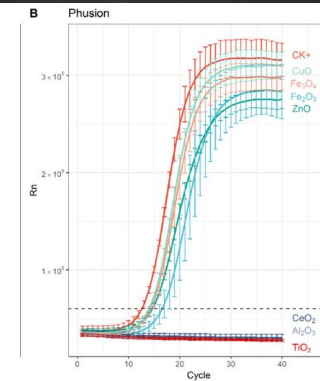
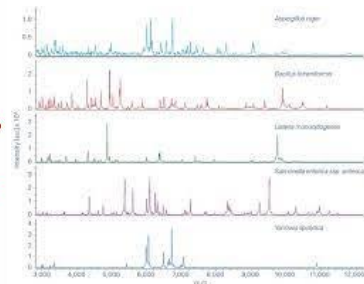
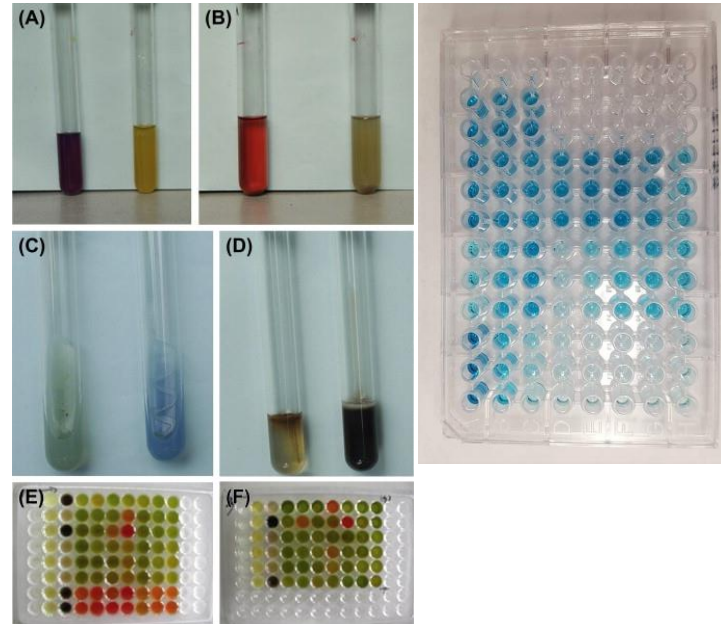
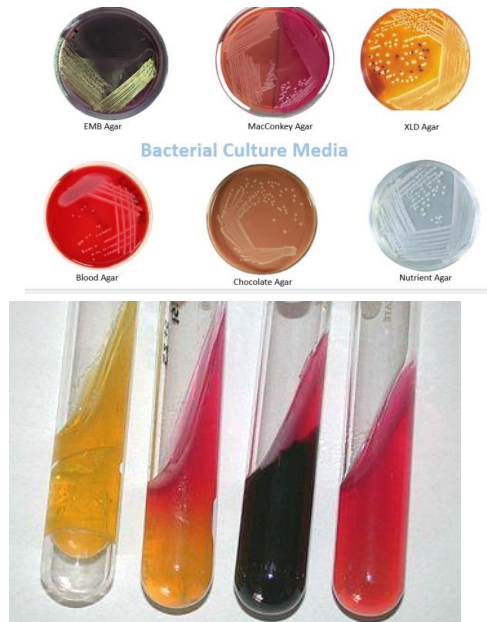
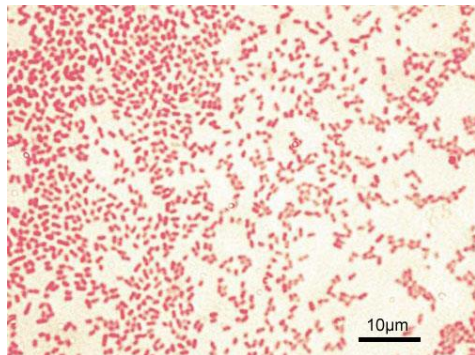


Prof. Marcio V B Dias
mvbdias@usp.br

O ambiente clínico

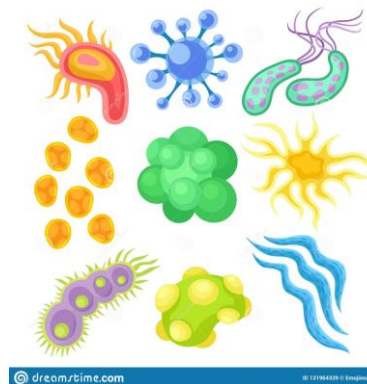
Os laboratórios de microbiologia clínica
devem identificar patógenos com segurança,
rapidez e eficiência

Como? Qual finalidade?





Segurança do laboratório



O laboratório de microbiologia clínico oferece muitos riscos

Toda amostra é potencialmente contaminada!!!!

Principal causa de acidentes nos laboratórios ignorância e falta de cuidados

Treinamento é extremamente necessário

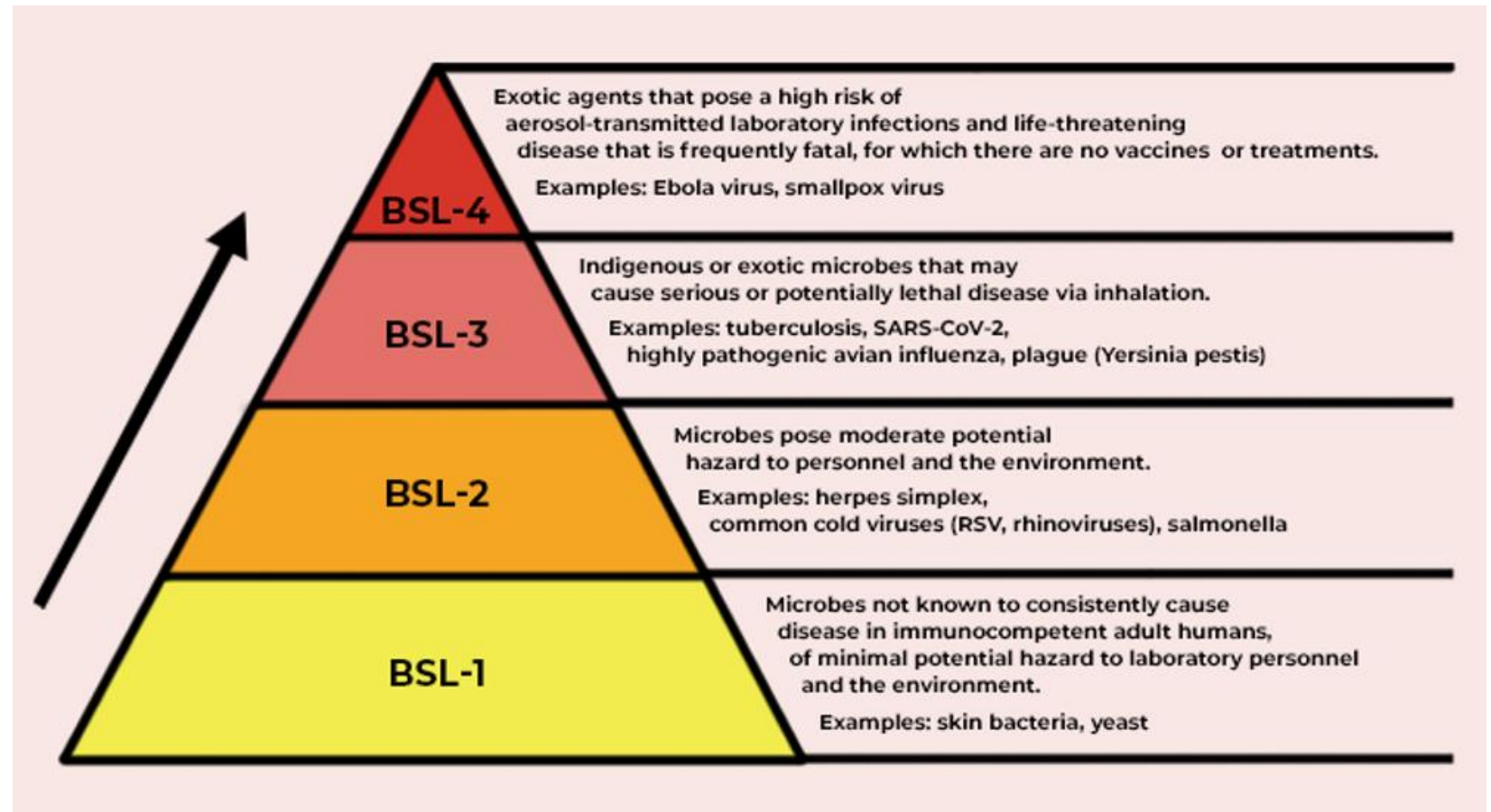
A maior parte da contaminação não é por exposição identificável

A maior parte da contaminação é por manipulação de amostras

Tabela 27.1 Normas de segurança em laboratórios de microbiologia

Regra	Implementação
Acesso restrito	Apenas os profissionais do laboratório e a equipe de apoio têm acesso
Boas práticas de higiene pessoal	Comer, beber e aplicar produtos cosméticos são proibidos no laboratório. A lavagem das mãos impede a propagação de agentes patogênicos
Uso de equipamento de proteção individual	Jalecos, luvas, proteção para os olhos e respiradores são recomendados ou exigidos dependendo do patógeno que está sendo manuseado
Vacinação	As pessoas devem ser vacinadas contra os patógenos que poderão entrar em contato
Bom manuseio de espécimes	Considerar os espécimes clínicos como infecciosos e manuseá-los de forma adequada
Descontaminação	Após a utilização ou exposição, descontaminar as amostras, superfícies e materiais por desinfecção, autoclavagem ou incineração

Contenção biológica e níveis de segurança

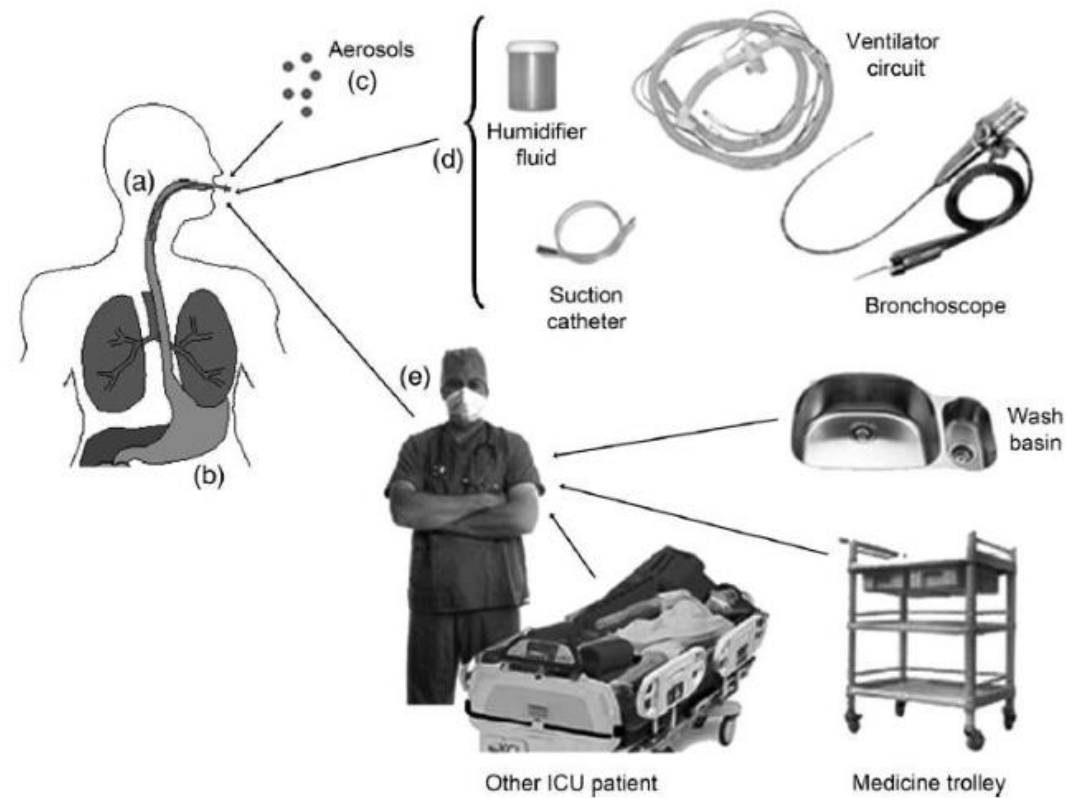
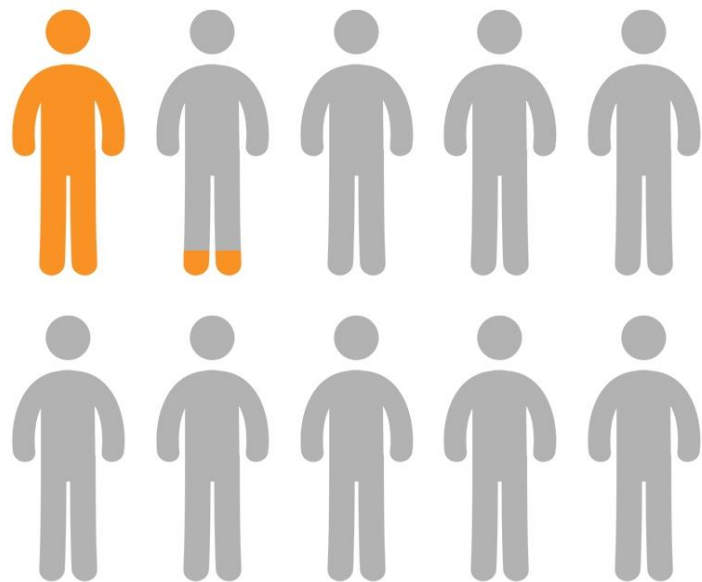


Níveis de biosegurança

Biosafety Level	BSL-1	BSL-2	BSL-3	BSL-4
Description	· No Containment · Defined organisms · Unlikely to cause disease	· Containment · Moderate Risk · Disease of varying severity	· High Containment · Aerosol Transmission · Serious/Potentially lethal disease	· Max Containment · "Exotic," High-Risk Agents · Life-threatening disease
Sample Organisms	E.Coli	Influenza, HIV, Lyme Disease	Tuberculosis	Ebola Virus
Pathogen Type	Agents that present minimal potential hazard to personnel & the environment.	Agents associated with human disease & pose moderate hazards to personnel & the environment.	Indigenous or exotic agents, agents that present a potential for aerosol transmission, & agents causing serious or potentially lethal disease.	Dangerous & exotic agents that pose a high risk of aerosol-transmitted laboratory infections & life-threatening disease.
Autoclave Requirements	None	None	Pass-thru autoclave with Bioseal required in laboratory room.	Pass-thru autoclave with Bioseal required in laboratory room.

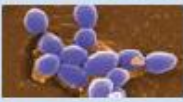
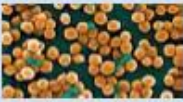
Infecções associadas aos cuidados da saúde

Infecções hospitalares afetam
14 em cada 100 pacientes internados.



Bactérias comuns nas doenças nosocomiais

SKAPE

Tabela 27.4 Patógenos associados aos cuidados de saúde		
Patógeno	Sítios comuns de infecção e doenças	Micrografias ^b
^a <i>Acinetobacter</i>	Ferimentos/sítios cirúrgicos, corrente sanguínea, pneumonia, trato urinário	 <i>Acinetobacter</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Pneumonia	 <i>B. cepacia</i>
<i>Clostridium difficile</i> , <i>C. sordellii</i>	Gastrointestinal Pneumonia, endocardite, artrite, peritonite, mionecrose	 <i>C. difficile</i>
^a Enterobacteriaceae, resistentes ao carbapenem, especialmente <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i>	Pneumonia, ferimentos/sítios cirúrgicos, corrente sanguínea, meningite	 <i>E. coli</i>
^a <i>Enterococcus</i> resistentes a vancomicina (VRE)	Ferimentos/sítios cirúrgicos, corrente sanguínea, trato urinário	 <i>Klebsiella</i>
Hepatite	Infecção hepática crônica	 <i>Enterococcus</i>
Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	Imunodeficiência	 Vírus da hepatite B
Vírus <i>influenza</i>	Pneumonia	 HIV
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Infecções de pele e tecidos moles	 Vírus <i>influenza</i>
^a <i>M. tuberculosis</i>	Infecção pulmonar crônica (tuberculose)	 <i>M. tuberculosis</i>
<i>Norovirus</i>	Gastroenterite	 <i>Norovirus</i>
^a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA), com suscetibilidade intermediária a vancomicina, e resistente a vancomicina (VISA, VRSA)	Corrente sanguínea, pneumonia, endocardite, osteomielite	 <i>S. aureus</i>

Identificação de bactérias

Fases do Ciclo Diagnóstico:

- **Fase Pré-analítica:**

- Começa na coleta de material,
- Seja ela feita pelo paciente (urina, fezes e escarro)/seja feita no ambiente laboratorial;
 - Coleta
 - Transporte

- **Fase analítica:**

- Corresponde à etapa de execução do teste propriamente dita;

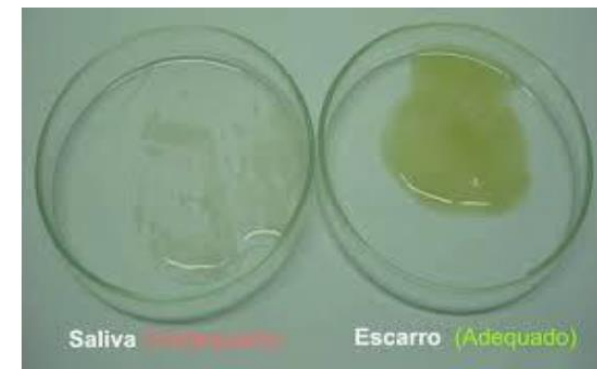
- **Fase pós-analítica :**

- Inicia-se no laboratório clínico e envolve os processos de validação e liberação de laudos, encerrando-se após o médico receber o resultado final, interpretá-lo e tomar sua decisão.



Identificação microbiológica de bactérias – fase pré-clínica

- Local correto da coleta – tecido contaminado
 - **Assepsia**
- Tamanho correto, se for necessário o crescimento
- Requisitos metabólicos devem ser mantidos (Ex. organismos anaeróbicos)
- Transporte e armazenamento corretos dos tecidos e espécimes
 - Preparação rápida e adequada da amostra
 - Objetivo da análise



TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

- Transportar as amostras **IMEDIATAMENTE** ao laboratório para:
 - Assegurar a sobrevivência e isolamento do microrganismo, pois o laboratório de microbiologia trabalha basicamente em função da viabilidade dos microrganismos;
 - Evitar o contato prolongado dos microrganismos com anestésicos utilizados durante a coleta, pois eles poderão exercer atividade bactericida;
 - Evitar erros de interpretação nas culturas quantitativas;
 - Consultar o laboratório para verificar a disponibilidade dos meios de transporte.



- ✓ A definição do tempo máximo permitido entre a coleta e o processamento de um determinado material clínico é um fator importante para um resultado confiável do exame;
- ✓ A temperatura de transporte é outro fator importante;
- ✓ Amostras de secreções do trato respiratório inferior, entre outras, são consideradas de urgência e devem ser processadas o mais rápido possível.

Amostra	Tempo Crítico	Frascos e Meios de Transporte
Liquor	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril
Líquido pleural	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril
Swab	Imediatamente (nao refrigerar)	Tubo seco estéril ou meio semi-solido (Stuart, Amies)
Suspeita de anaeróbios	30 minutos	Meio de transporte apropriado Evitar o transporte em seringa com agulha
Feridas e tecidos	30 minutos de ou até 12 horas (meio de transporte)	Meio de transporte apropriado
Hemocultura	30 minutos (não refrigerar)	Frascos com meios de cultura para rotina manual ou automatizada
Trato respiratório	30 minutos	Tubo seco estéril
Trato gastrointestinal	1 hora	Tubo seco estéril
Urina	1 hora ou refrigerada até 24 horas	Pote seco estéril
Fezes	12 horas se em meio de transporte	Cary Blair meio modificado para transporte de fezes, com pH 8,4. Boa recuperação também para <i>Vibrio sp</i> e <i>Campylobacter sp</i>

2. Meio de Transporte:

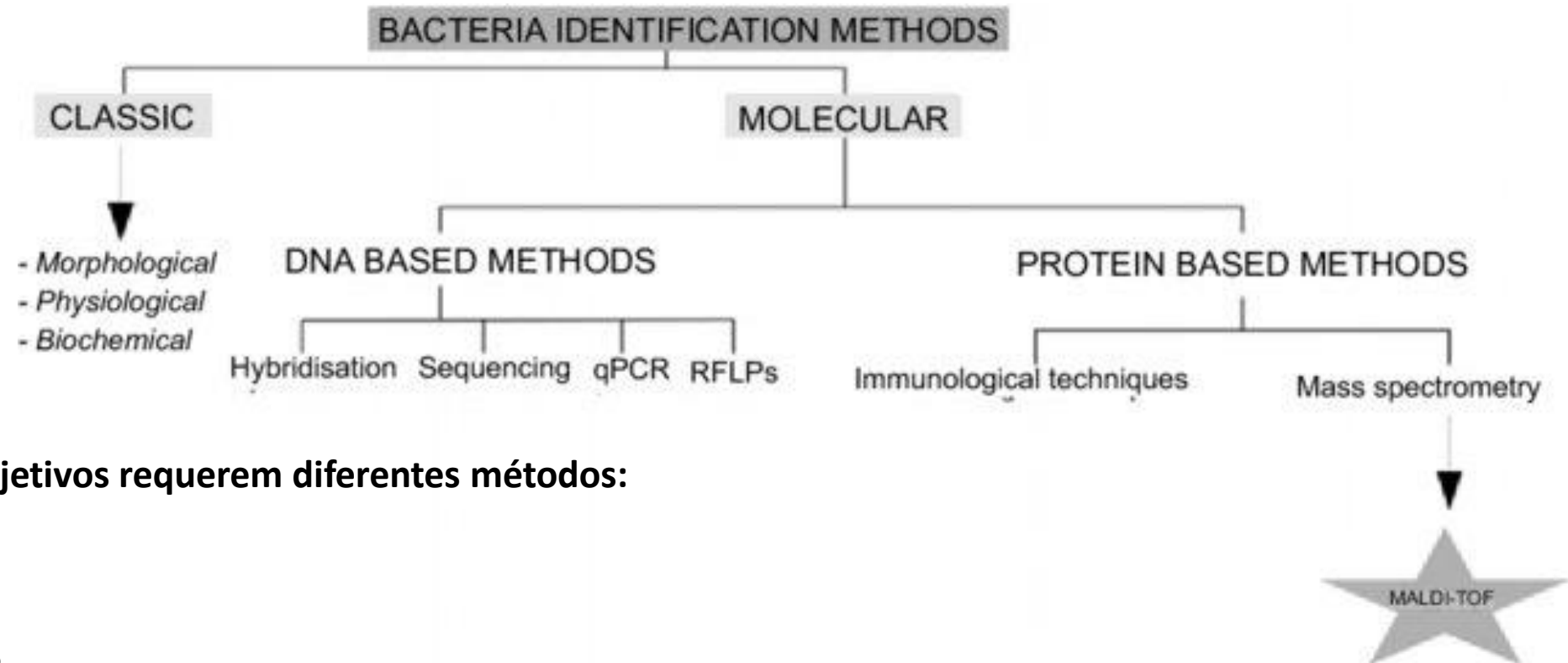
- Consiste em um meio pouco nutritivo;
- Geralmente mantém o pH favorável, previne a desidratação de secreções durante o transporte e evita a oxidação (agente redutor) e autodestruição enzimática dos patógenos presentes.

Ex.: Meio de Stuart, Meio de Cary-Blair e Caldo Tioglicolato.



Fase analítica

Como analisar as amostras? Quais métodos?



Diferentes objetivos requerem diferentes métodos:

-clínico?

-filogenético?

-metagenômico?

-resistência a antimicrobianos?

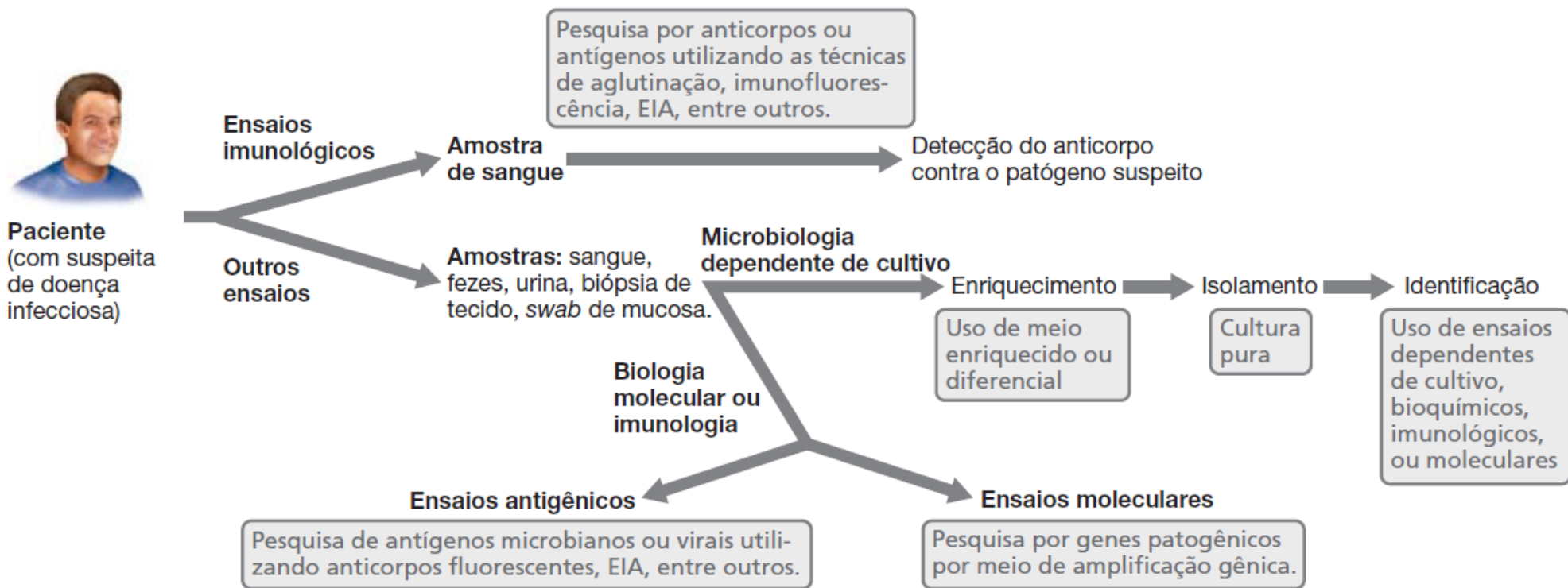
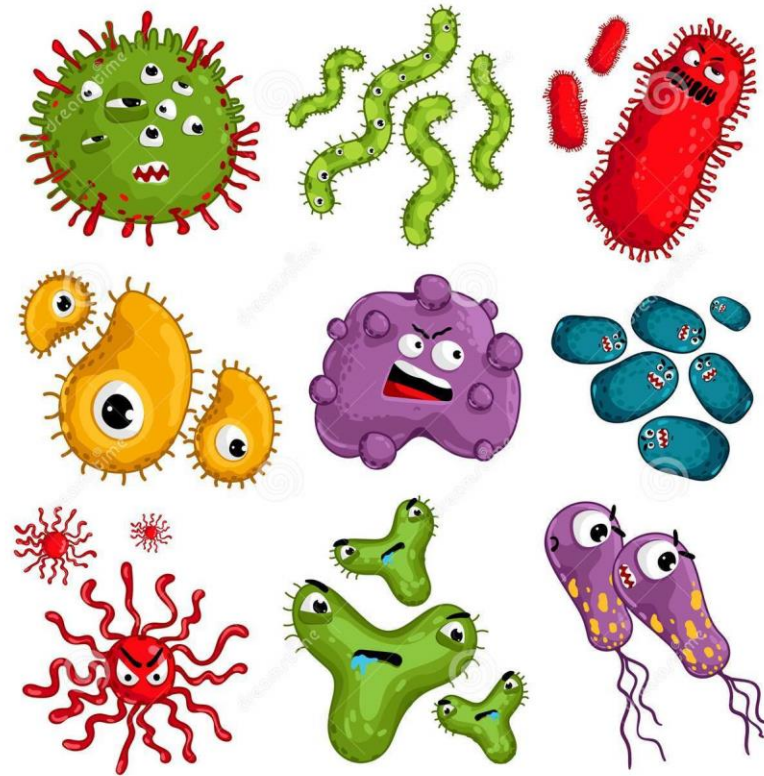


Figura 27.3 **Identificação laboratorial de patógenos microbianos.** O fluxograma apresenta vias alternativas para a identificação de patógenos ou da exposição a patógenos em um laboratório clínico.

Microscopia

Pode dizer muito a respeito da bactéria

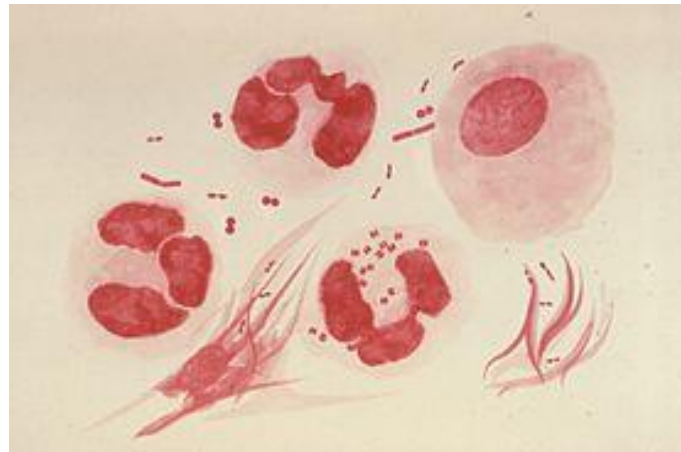


11308000
Sergiy Kostko | Dreamstime.com

Download from
Dreamstime.com
The watermark is for identification purposes only.

A maioria das bactérias são detectadas por métodos diretos

- **Especificidade (%)**
- **Sensibilidade (%)**
- **Pode variar de acordo com sexo**



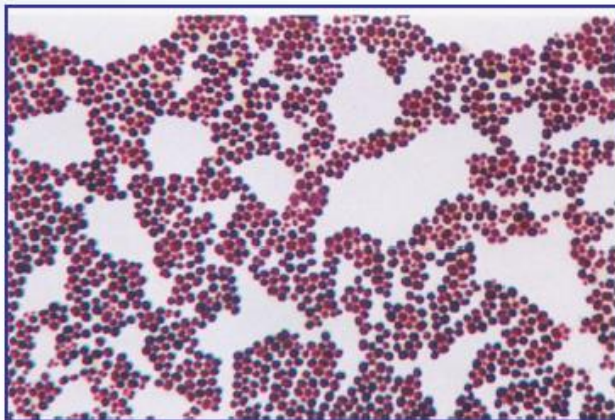
Neisseria gonorrhoeae
especificidade: H=99%; M=95%
sensibilidade: H= 90%; M=50%

**Métodos diretos= aqueles
que se observa a bactéria**

Bacterioscopia

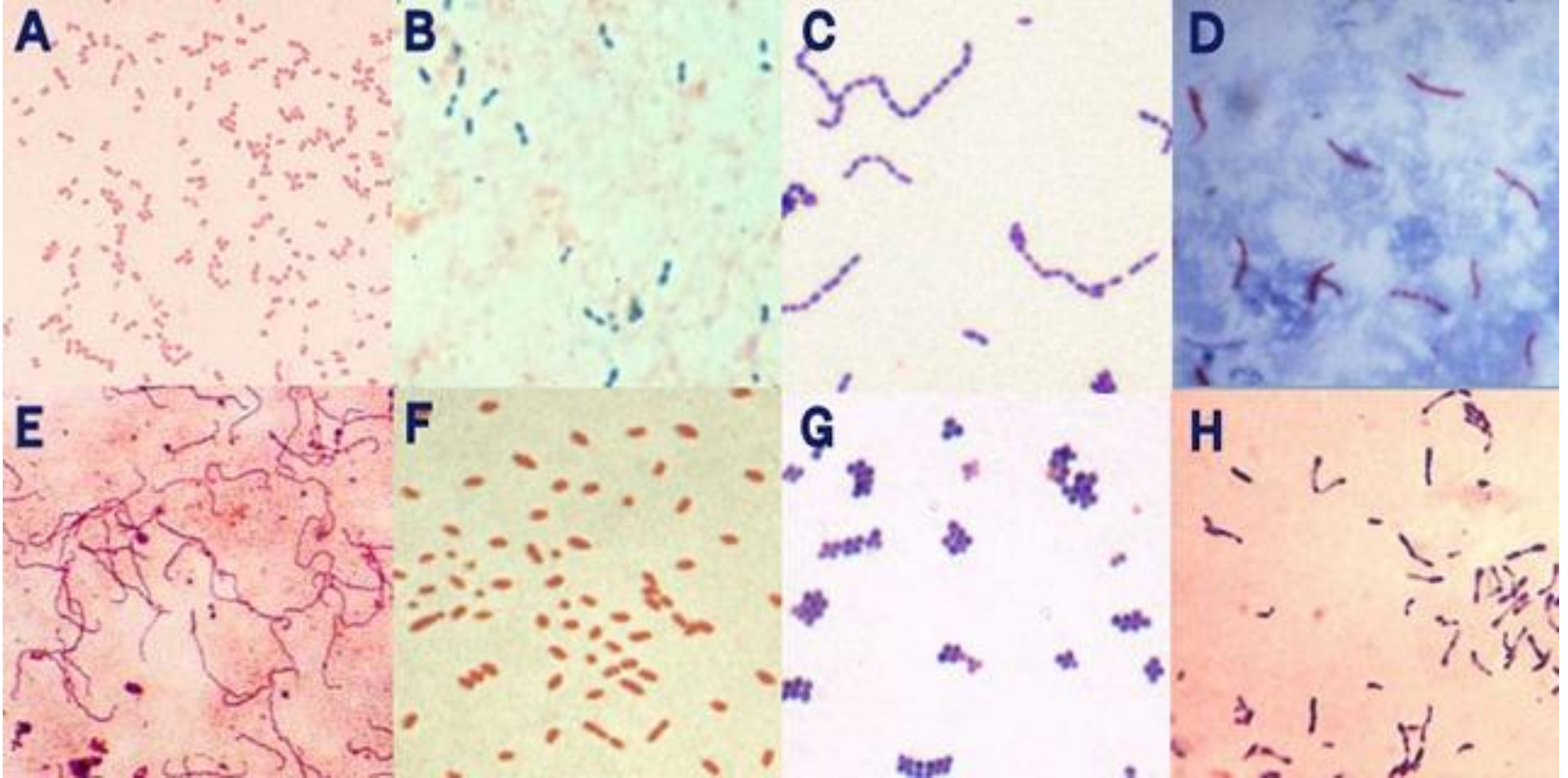


Preparação “a fresco”



Preparação “coradas”





A: *Neisseria meningitidis* - Diplococos Gram-negativos; B: *Streptococcus pneumoniae* - Cocos ou diplococos Gram-positivos; C: *Streptococcus mutans* - Estreptococos Gram-positivos; D: *Mycobacterium tuberculosis* - Bacilo Álcool-Ácido Resistente; E: *Treponema pallidum* - Espiroquetas Gram-negativas; F: *Bordetella pertussis* - Cocobacilos Gram-negativos; G: *Staphylococcus aureus* - Estafilococos Gram-positivos; H: *Corynebacterium diphtheriae* - Bactérias pleomórficas (geralmente bastões) Gram-positivas

Bacterioscopia

Permite identificar infecções

Todas essas pranchas de um esfregaço vaginal corado por Gram caracteriza uma infecção?

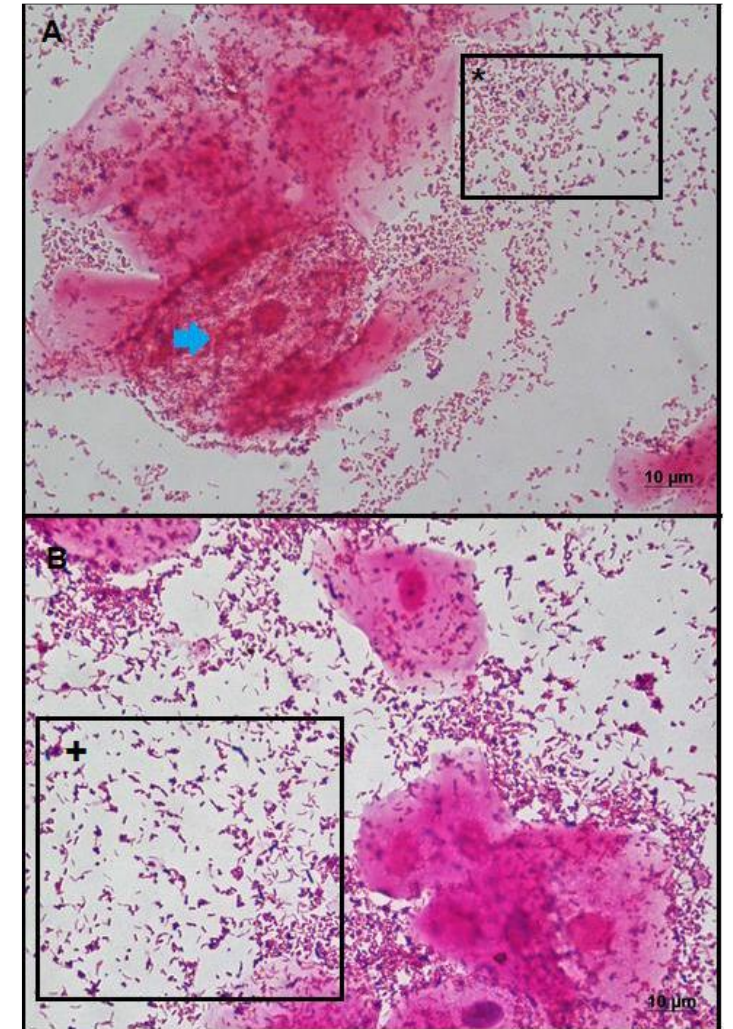
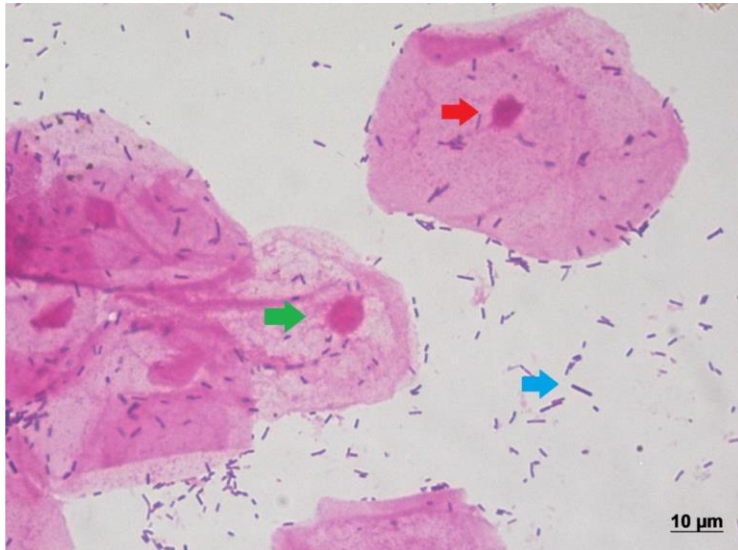
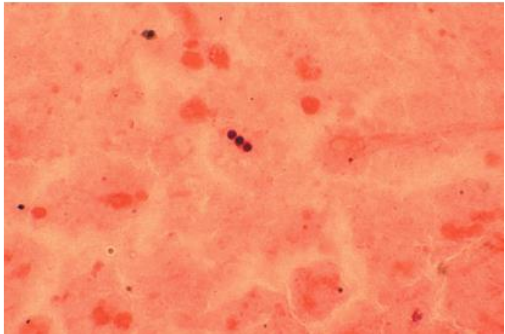
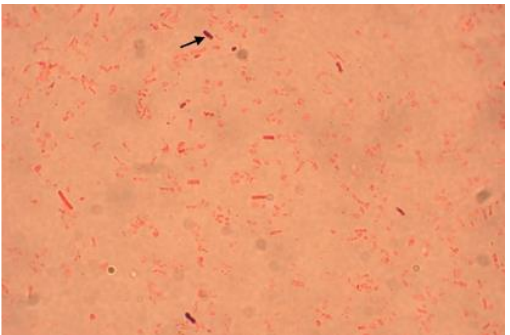
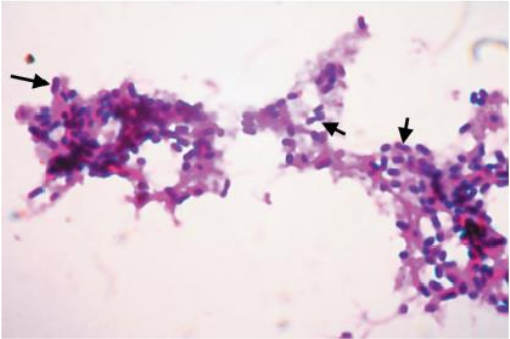
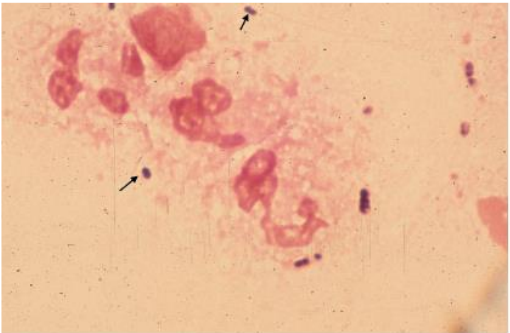


Tabela 1.10 Armadilhas da interpretação das colorações por Gram.

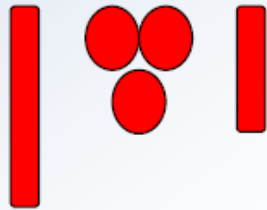
Microrganismos	Apresentação clássica	Variação	Comentários
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Diplococos gram-positivos em forma de lancetas	Cocos alongados semelhantes a bacilos curtos	Podem ser confundidos com microrganismos mistos; as células descoloridas excessivamente podem ser confundidas com cocobacilos gram-negativos
<i>Acinetobacter</i> spp.	Cocobacilos gram-negativos	Cocos gram-negativos; é comum encontrar coloração variável ao Gram	Podem ser confundidos com espécies de <i>Neisseria</i> e relatados como cocos gram-negativos; examinar cuidadosamente o esfregaço para encontrar alguns microrganismos que apresentam formas alongadas, que não ocorrem com <i>Neisseria</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	Bacilos gram-positivos com formato de bastonetes	Cocos gram-positivos	Podem ser confundidos com <i>Streptococcus pneumoniae</i> e relatados como cocos gram-positivos; além disso, as células com formato de cocos retêm firmemente o violeta cristal durante a descoloração
		Bacilos gram-negativos ou com coloração variável	Podem ser confundidos com bacilos gram-negativos; o formato de bastonete é um indício de que o microrganismo é gram-positivo; outras espécies de <i>Clostridium</i> e <i>Bacillus</i> também podem ter aspecto semelhante
Leveduras, especialmente <i>Cryptococcus neoformans</i>	Células gram-positivas ovais ou redondas com germinação	Células com coloração variável ao Gram	Podem ser confundidas com artefatos; o tamanho e a forma diferenciam as leveduras das bactérias



Identificação de Micobactérias

MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN:

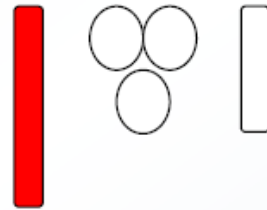
Solução de **Fucsina de Ziehl-Neelsen**,
fenicada,
concentrada à
quente por 5 min



Corante



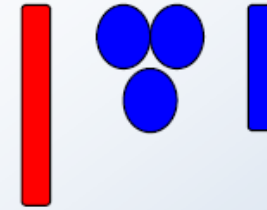
**Solução
Álcool
Ácida**



Descorante



Solução de
**Azul de
Metileno**



Corante

Interpretação
do Resultado:

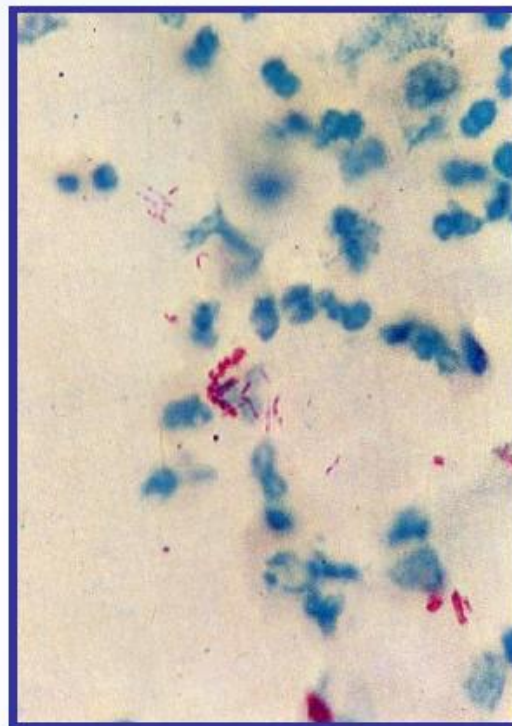
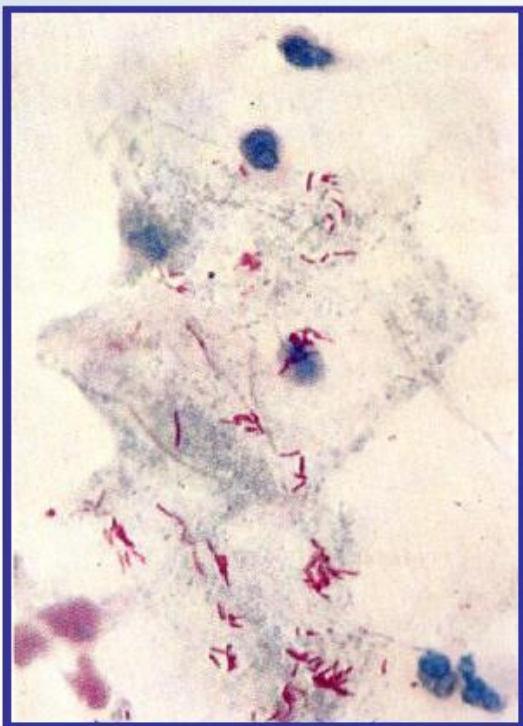
Reação Positiva = Vermelha

Reação Negativa = Azul

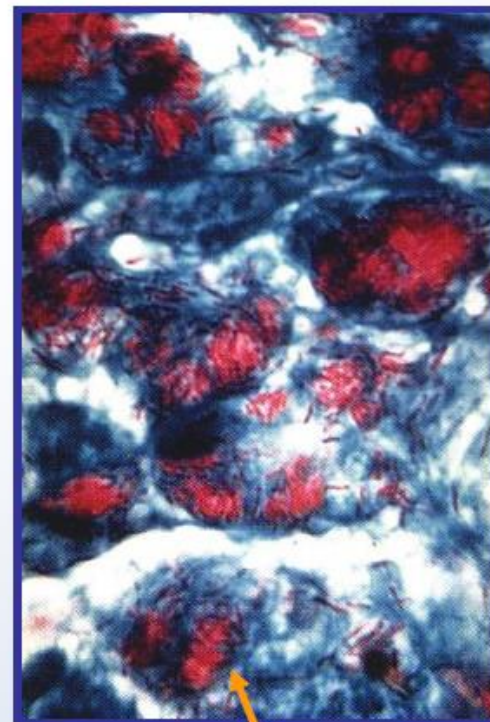
**BAAR= Bacilo Álcool-
Ácido Resistente**

MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN:

Tuberculose



Hanseníase



Globia

Fase Analítica - Meios de Cultura

- Seleção de meios de cultura primários;
- Transferência e cultura das amostras clínicas;
- Interpretação das culturas e análise dos resultados.

1. Meio de Enriquecimento:

MEIOS DE ENRIQUECIMENTO

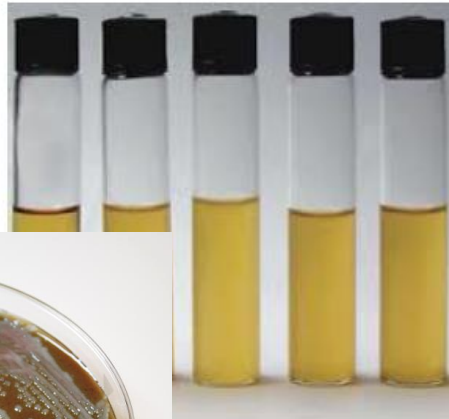
- São meios utilizados para isolar um microrganismo de um meio em que está presente em pequena quantidade.

- São meios enriquecidos com sangue, soro ou outros nutrientes.

Ex: Ágar sangue, Ágar chocolate.

- Geralmente líquido, de composição química rica em nutrientes, com finalidade de permitir que as bactérias contidas em uma amostra clírica aumentem em número.

Ex.: Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Caldo Tetrationato.



Fórmula* por Litro de Água Purificada

Cérebro-coração, infusão de (sólidos)	8,0 g
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0
Hidrolisado pancreático de caseína	16,0
Cloreto de sódio	5,0
Glucose	2,0
Fosfato dissódico de hidrogénio	2,5
Ágar	13,5

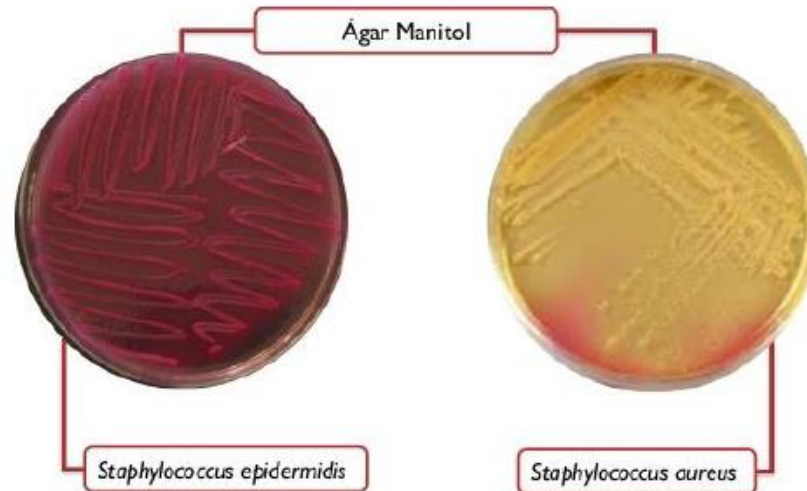
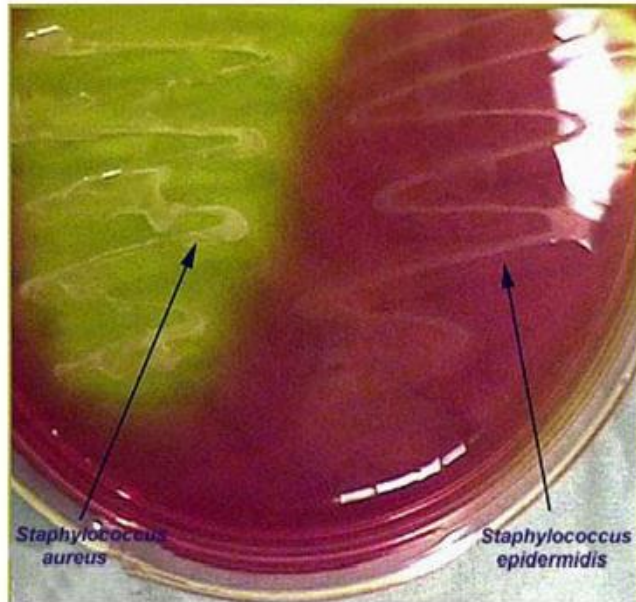
pH 7,4 ± 0,2

3. Meio Seletivo

- A finalidade deste tipo de meio é selecionar as espécies que se deseja isolar e impedir o desenvolvimento de outros microrganismos (adição de corantes, antibióticos e outras substâncias com capacidade inibitória para alguns microrganismos).

Ex.: Agar Manitol Salgado e Agar SS

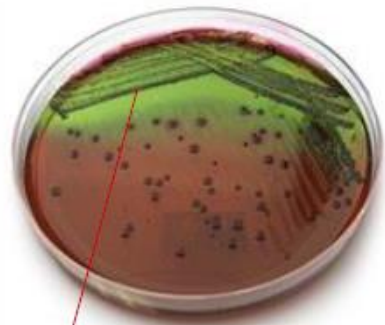
Ágar Manitol (7,5% NaCl)



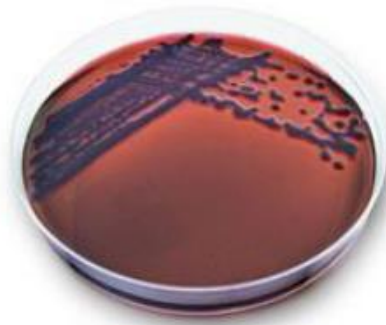
4. Meio Diferencial

- Possibilita a distinção entre vários gêneros e espécies de microrganismos, por possuir substâncias que permitem uma diferenciação presuntiva, evidenciada na mudança de coloração ou na morfologia das colônias.
- Enterobactérias e outros bacilos Gram negativos

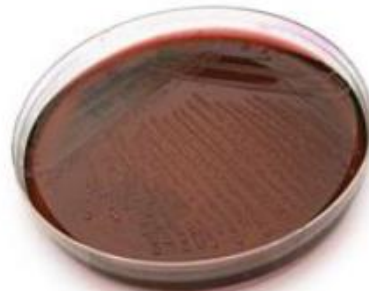
Ex.: Agar Eosin Methilene Blue (EMB), Agar McConkey e Agar Hektoen



E. coli



K. pneumoniae



S. enteritidis

Cor verde: fermentação
da lactose e/ou sacarose

Inibe o crescimento
de G+

Fórmula* por Litro de Água Purificada

Hidrolisado pancreático de gelatina	10,0 g
Lactose	5,0
Sacarose	5,0
Fosfato dipotássio	2,0
Agar	13,5
Eosina Y	0,4
Azul-de-metileno	0,065
pH 7,2 ± 0,2	

Agar McConkey



Escherichia coli



Enterobacter aerogenes



Proteus vulgaris



Salmonella typhimurium



Staphylococcus aureus

↑
**Lactose
fermenting
colonies**

PINK

↑
**Non-lactose
fermenting
colonies**

COLORLESS

MacConkey's Agar

REAGENTES

BD MacConkey II Agar

Fórmula* por Litro de Água Purificada

Hidrolisado pancreático de gelatina	17,0 g
Hidrolisado pancreático de caseína	1,5
Hidrolisado péptico de tecido animal	1,5
Lactose	10,0
Sais biliares	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Ágar	13,5

pH 7,1 ± 0,2

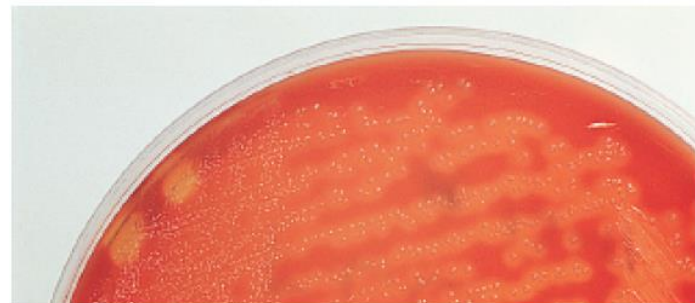
*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Identificação de bactérias baseado no crescimento em placas – Ex. ágar sangue

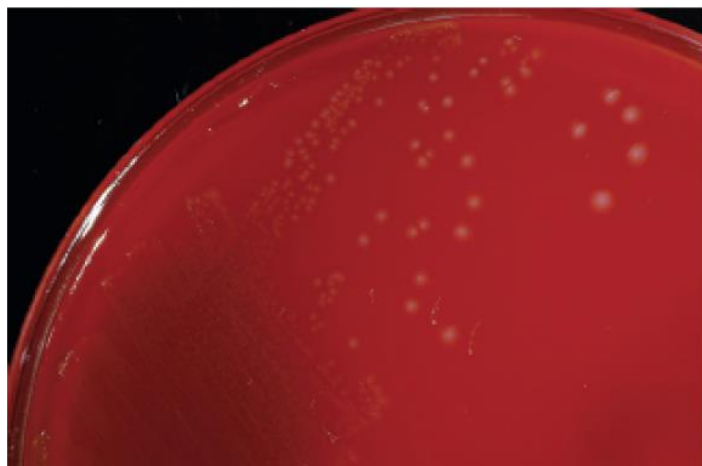
S. Aureus
coagulase negativo



Streptotococcus
coagulase positivo



Listeria monocytogenes
Hemólise fraca

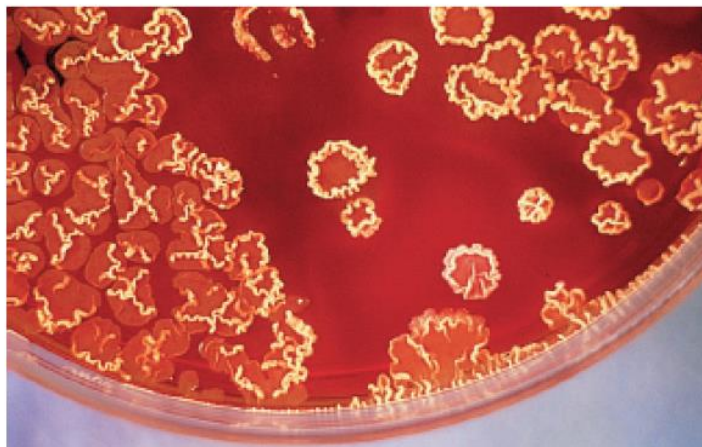


Mc Conkey (apresenta
indicador de pH) à
esquerda
Ágar sangue a direita

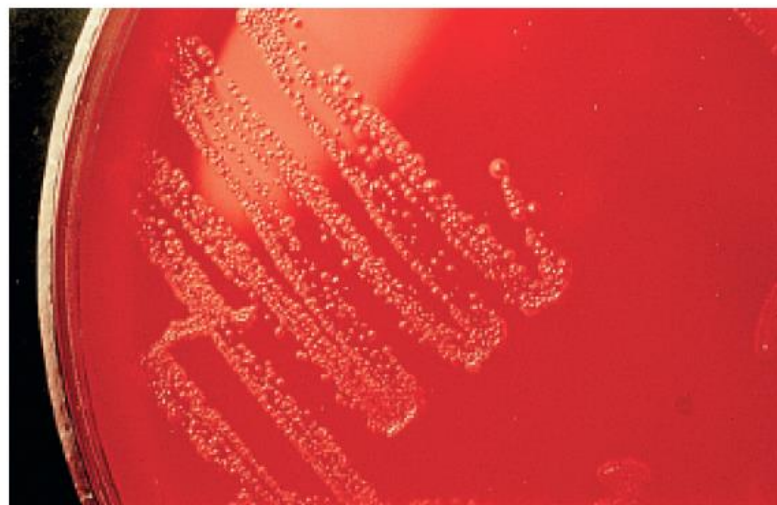


Salmonella (não
fermenta lactose)

Bacillus



Eikenella corrodens

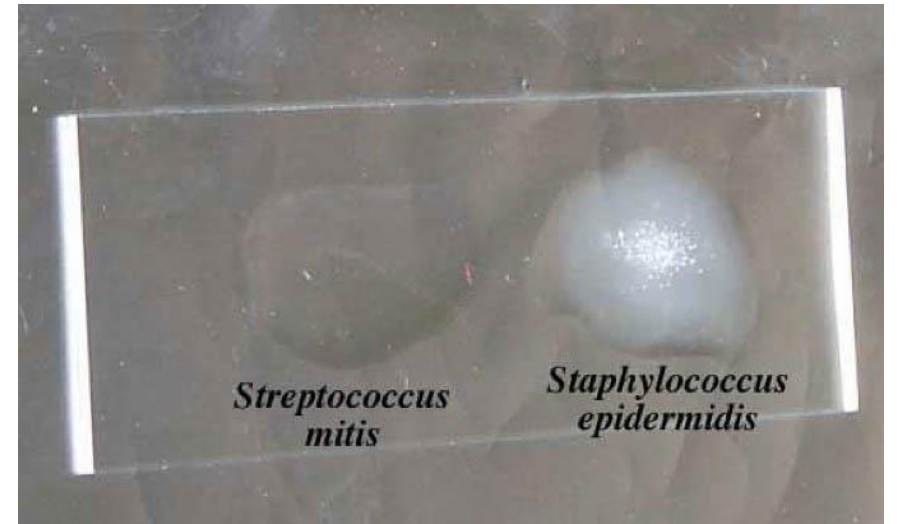
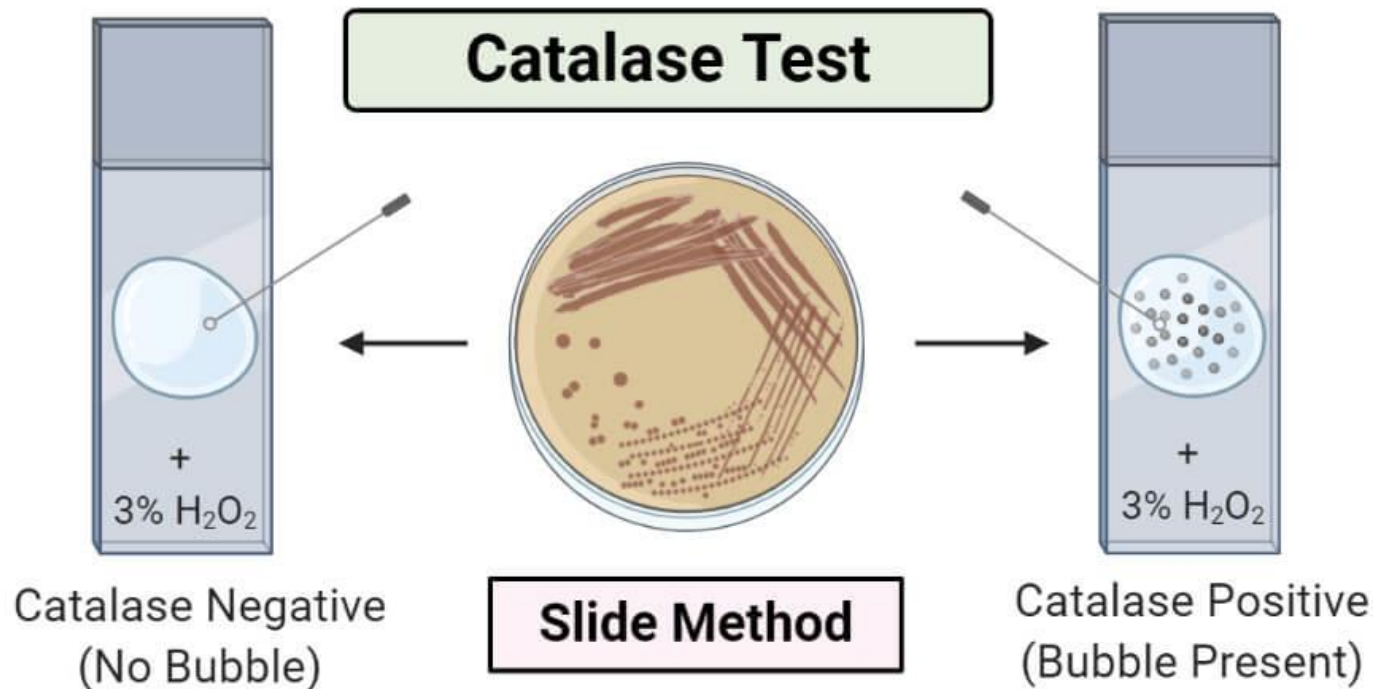


- Ágar Manitol - Famílias Micrococcaceae
- Ágar Mac Conkey, EMB - Crescimento de bactérias Gram negativas e indicar a fermentação de lactose
- Ágar Salmomella Shigella
- Ágar Sabouraud - Identificação de fungos patogênicos e leveduras.
- Ágar Bili-Esculina - Isolamento e identificação de estreptococos.
- Ágar Dnase - Recomendado para a detecção da atividade desoxiribonuclease de bactérias e fungos. *Staphylococcus aureus*.
- Ágar TSI - Diferenciação de patógenos entéricos (*E. coli*) pela capacidade de determinar a fermentação do carboidrato.
- Ágar Lowestein Jensen - *Mycobacterium tuberculosis*



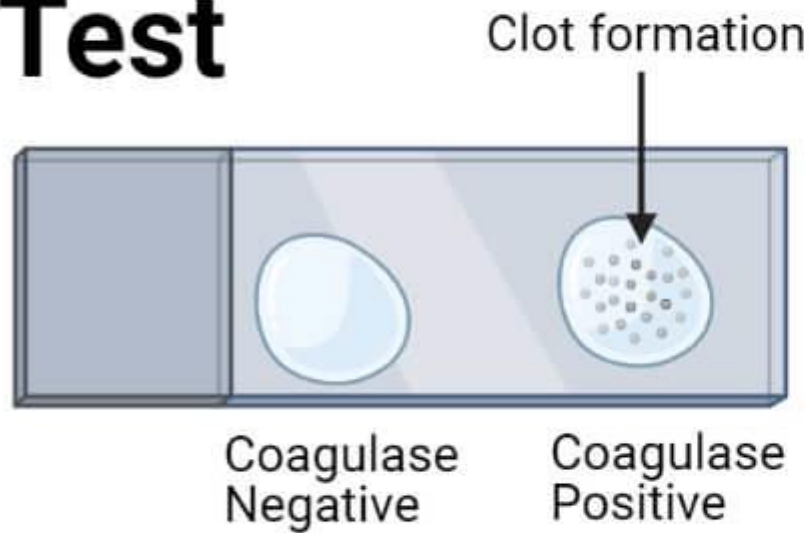
Testes bioquímicos

Teste de catalase – a presença da enzima catalase indica que o microrganismo é capaz de converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio



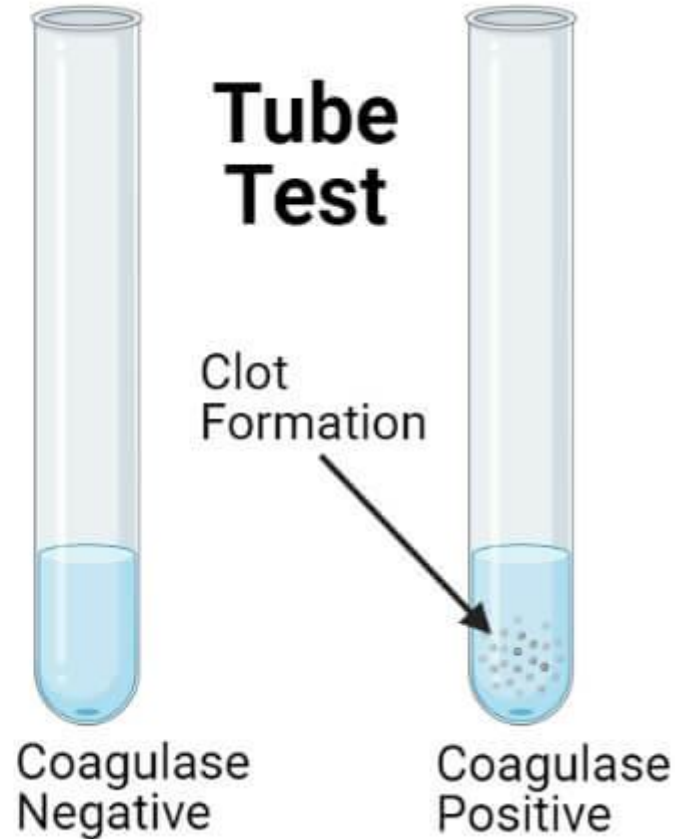
Teste de catalase: Catalase é um dos fatores de virulência de *S. aureus* e está ausente em outras espécies de *Staphylococcus*. Essa enzima é capaz de gerar agregado pela sua atividade semelhante a protrombina e, portanto converte fibrinogênio em fibrina. Para o teste utiliza-se plasma de sangue de coelho.

Coagulase Test



Slide Test

Tube Test



Coagulase tubes

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus

Teste de oxidase: Capaz de detectar bactérias que apresentam citocromo c oxidase e portanto são aeróbicas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria*. Porém nem todas as bactérias aeróbicas são estritamente positivas.

- Kovacs Oxidase Reagent:**

1% tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride, in water

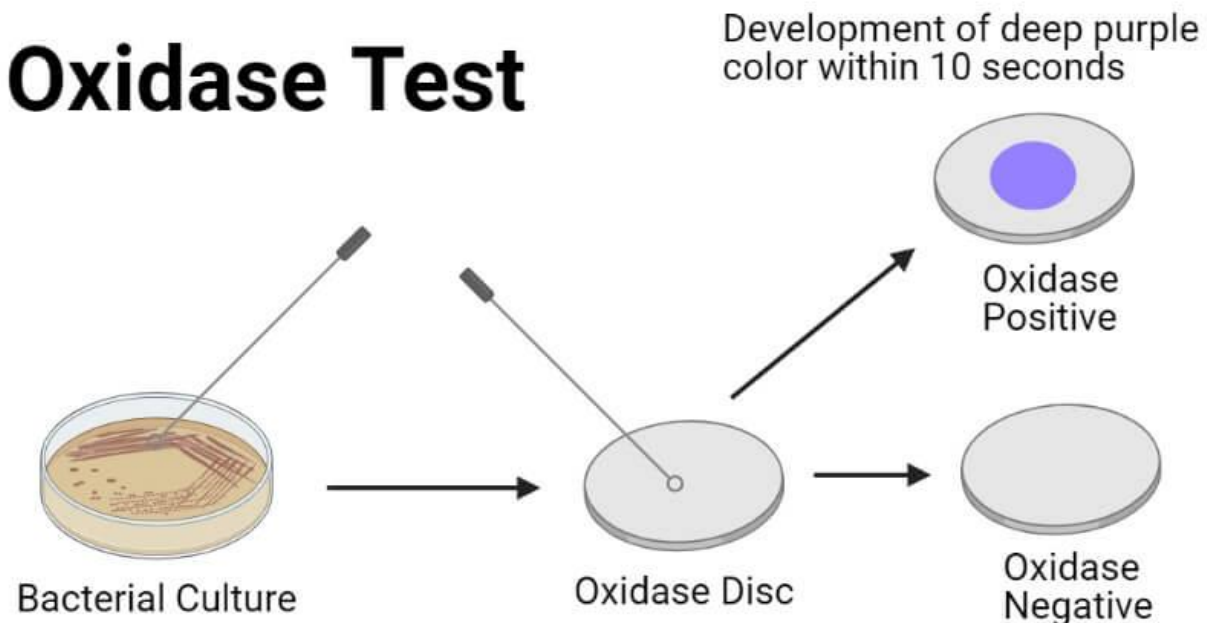
- Gordon and McLeod's Reagent:**

1% dimethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride, in water

- Gaby and Hadley (indophenol oxidase) Reagent:**

1% α -naphthol in 95% ethanol

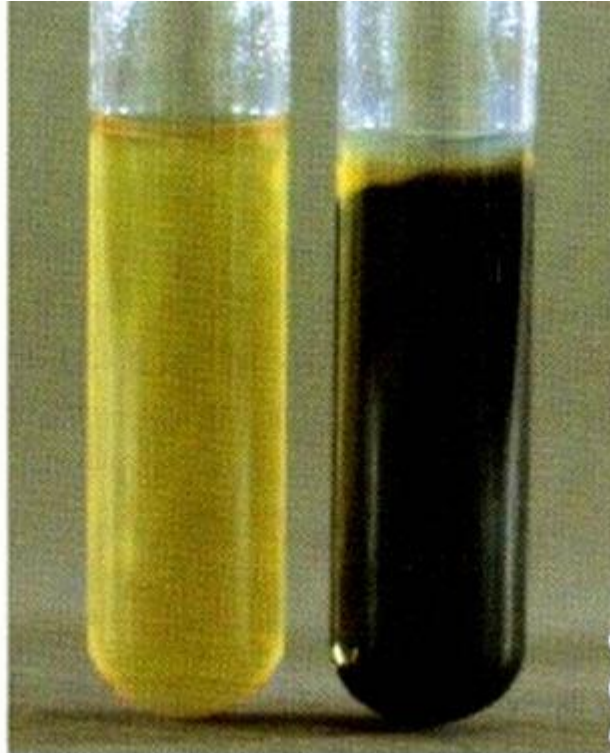
Oxidase Test



Teste de enxofre: Permite detectar bactérias que apresentam a capacidade de reduzir enxofre, ou seja, podem utilizar sulfato comoceptor final de elétrons, devido a presença da enzima tiosulfato redutase ou podem degradar o aminoácido cisteína devido a enzima cisteína desulfirase. Em ambos os casos há liberação de hidróxido de enxofre. O indicador é um composto que apresenta ferro, como sulfato de amônio ferroso , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

H_2S -NEGATIVE:

no black
precipitate
formed



H_2S -POSITIVE:

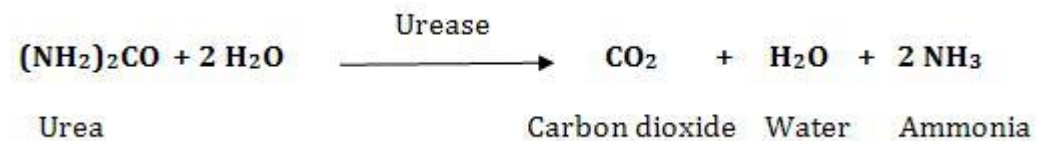
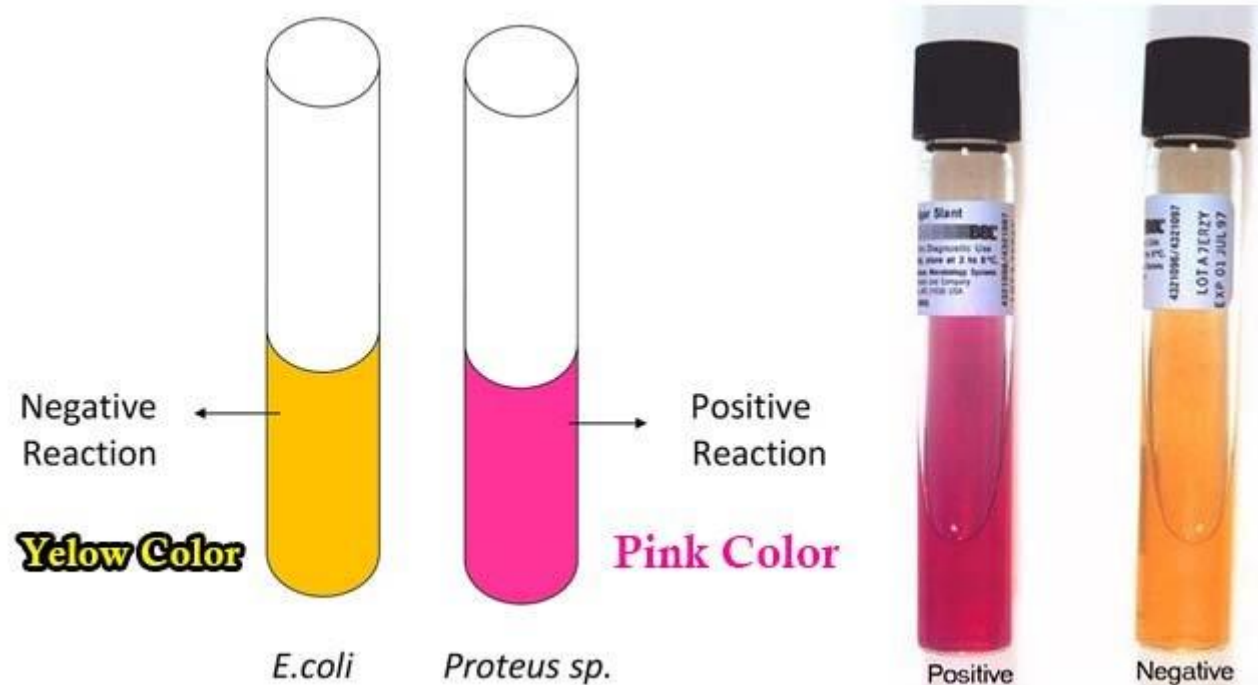
black precipitate
formed



Microbiology Info.com

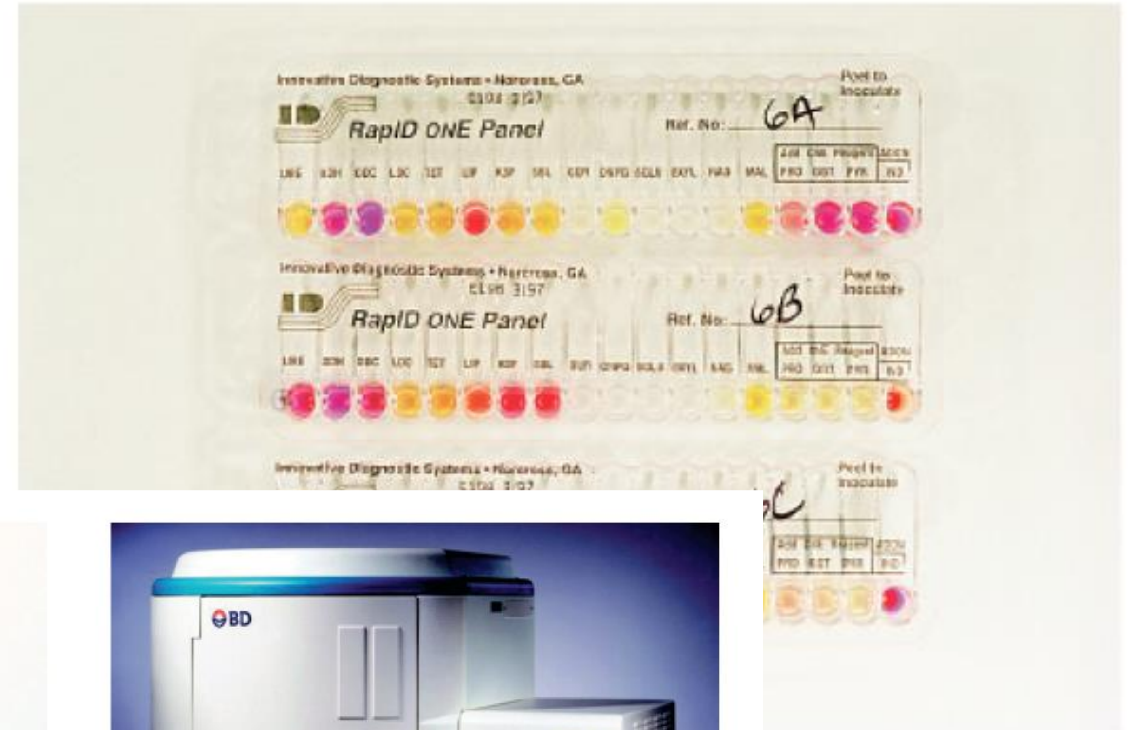
Bactérias capazes de reduzir enxofre incluem *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus*

Teste de urease: A urease é uma enzima capaz de quebrar a ureia em amônia e gás carbônico. Devido a presença da amônia, ocorre a alcalinização do meio na presença de fenol red.



Importante para detecção de *Helicobacter pylori*

Produtos disponíveis no mercado para identificação de bactérias



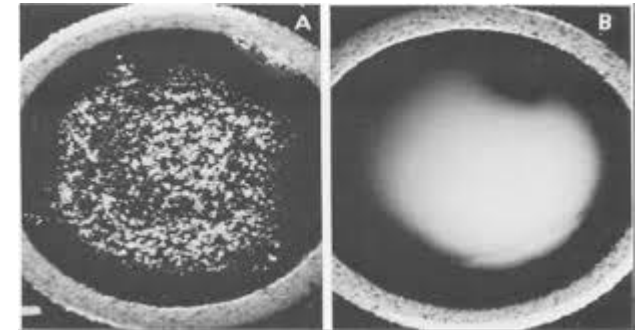
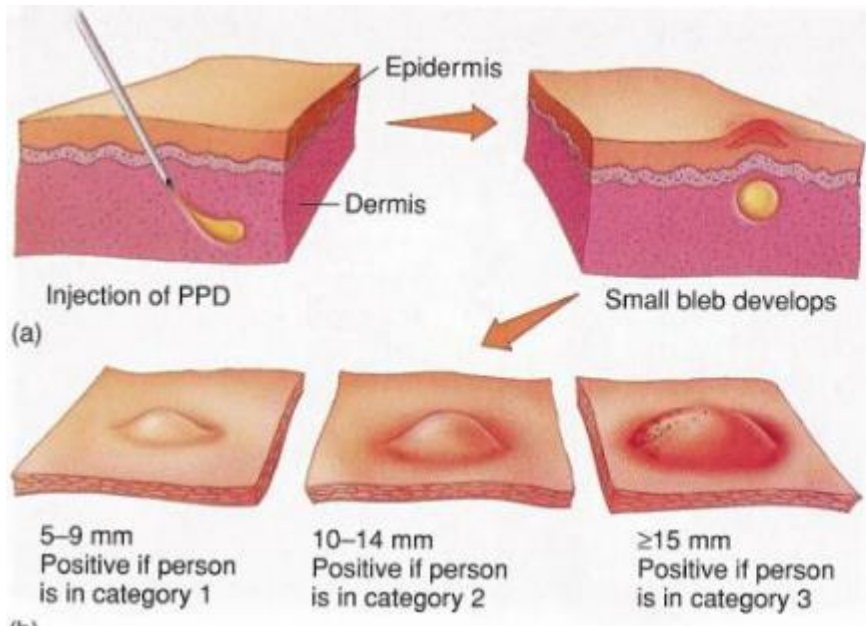
A



Métodos de diagnóstico independientes de cultivo

Ensaio imunológico

Podem ser realizados testes *in vitro* de detecção ou respostas imunes do hospedeiro



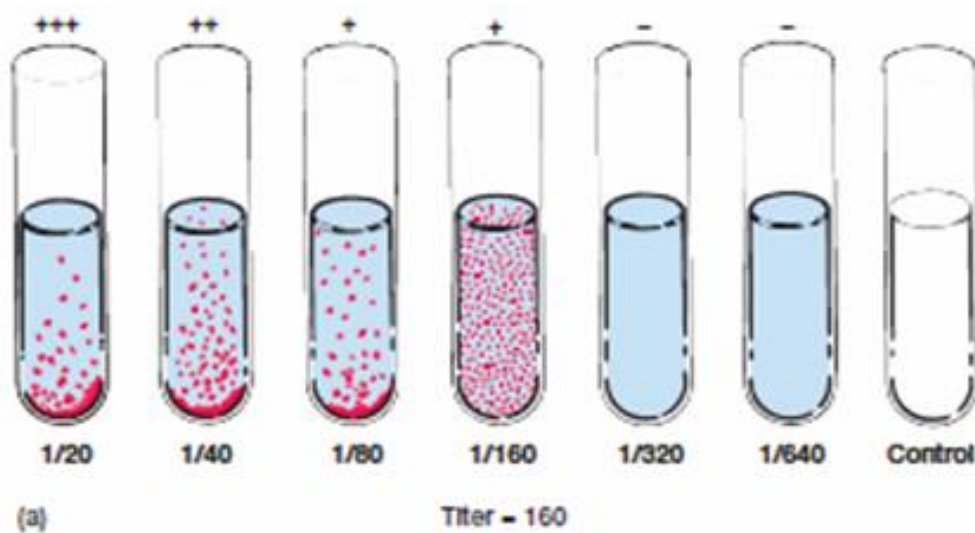
Teste de tuberculina para detecção de tuberculose

Sorologia – estudo das reações antígeno-anticorpo *in vitro* – detecção de anticorpos induzidos por patógenos.

Sorologia

Especificidade – reação antígeno-anticorpo capaz de identificar a exposição a um único patógeno

Sensibilidade – quantidades de anticorpos necessárias para a detecção do patógeno

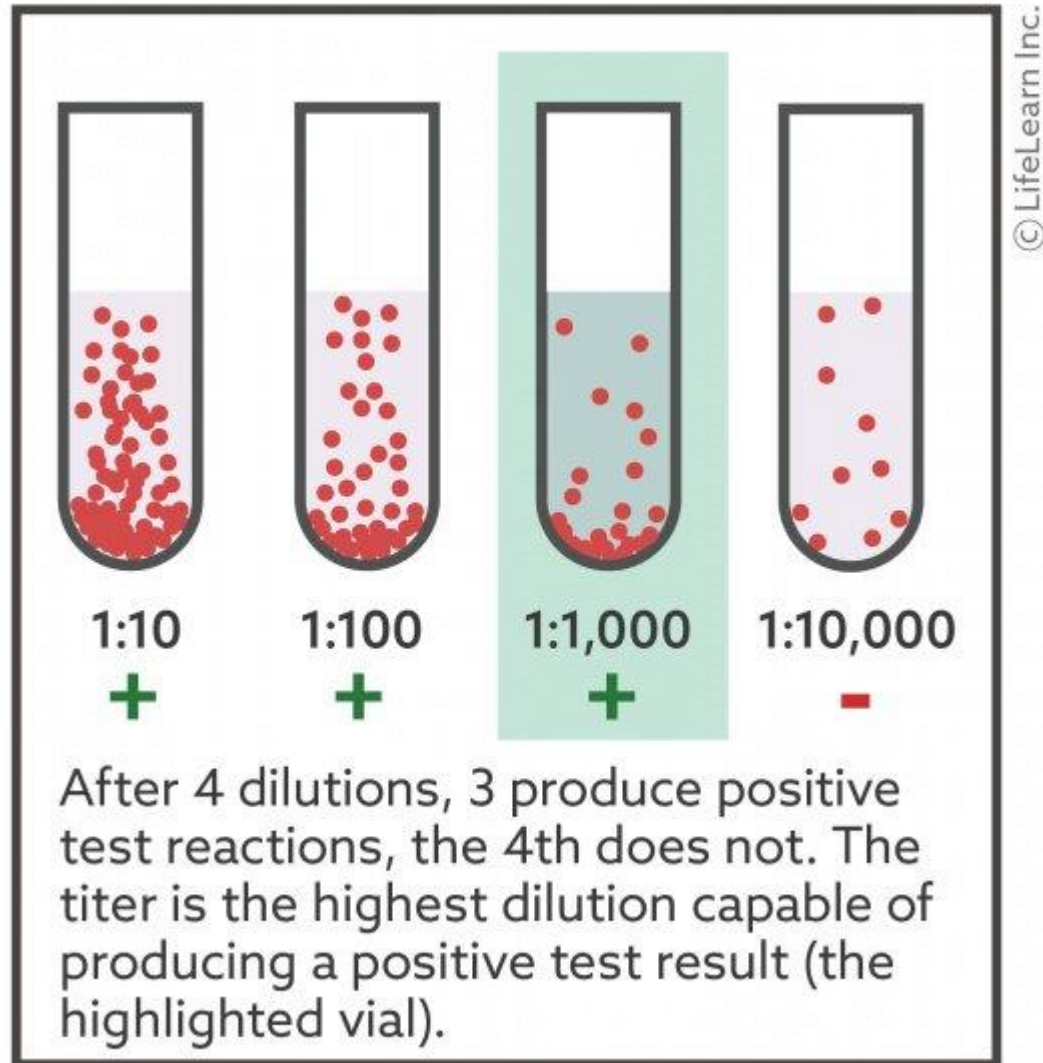


aglutinação



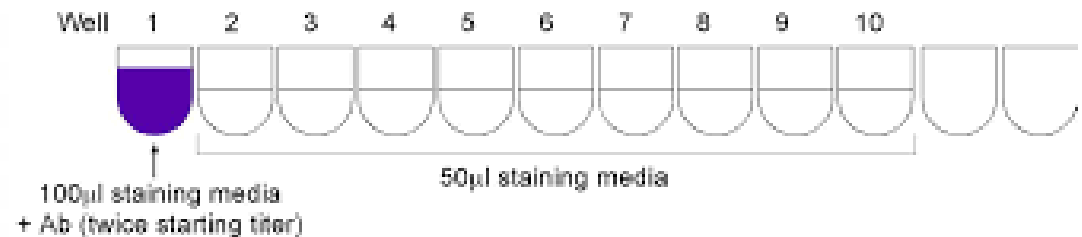
Ensaio imunoenzimático

Títulos de anticorpos

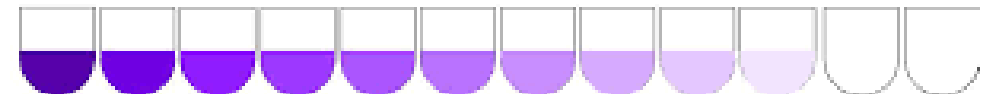


Título é a maior diluição (menor concentração) de soro na qual a reação antígeno-anticorpo é observada

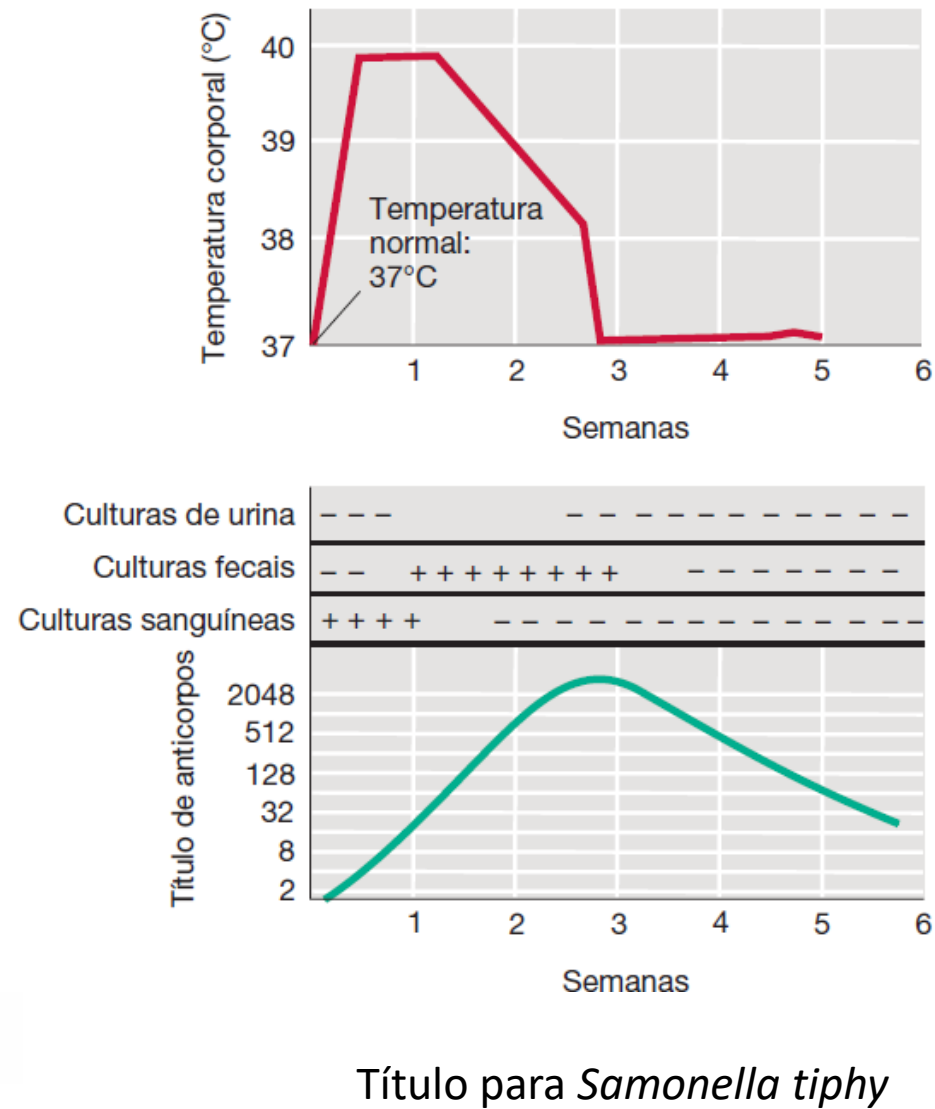
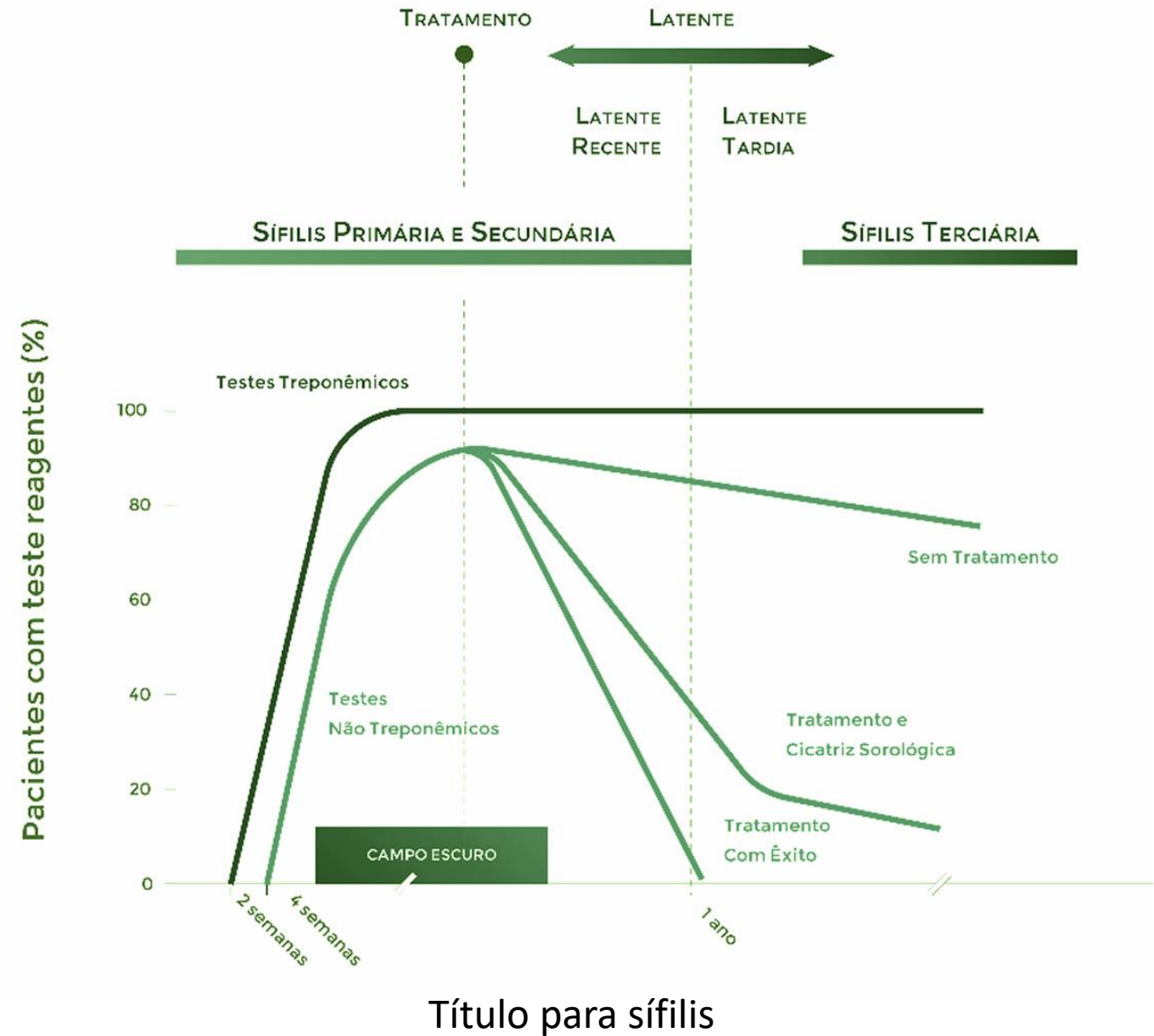
Before dilution:



After 2-fold dilution:

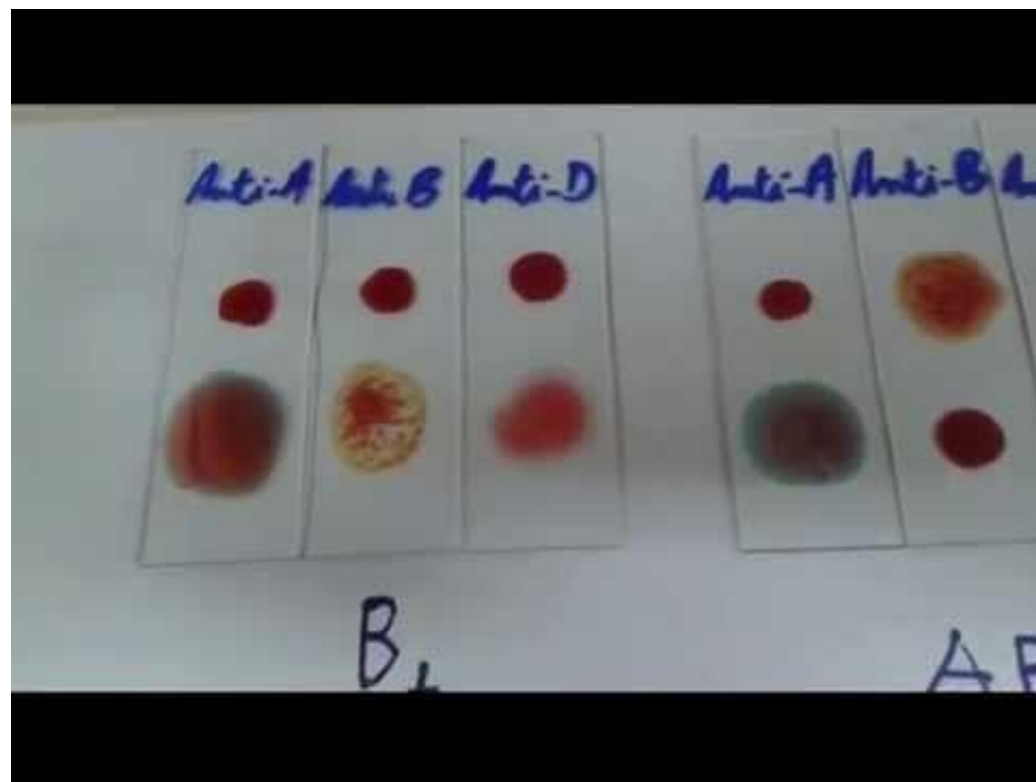


Um título positivo não necessariamente indica infecção ativa



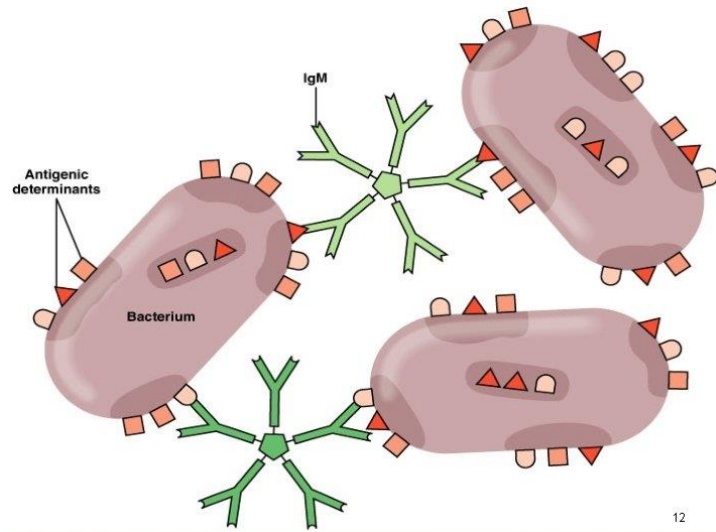
Testes de aglutinação

Aglutinação é a reação entre um anticorpo e um antígeno particulado, que resulta em aglomeração de partículas visíveis

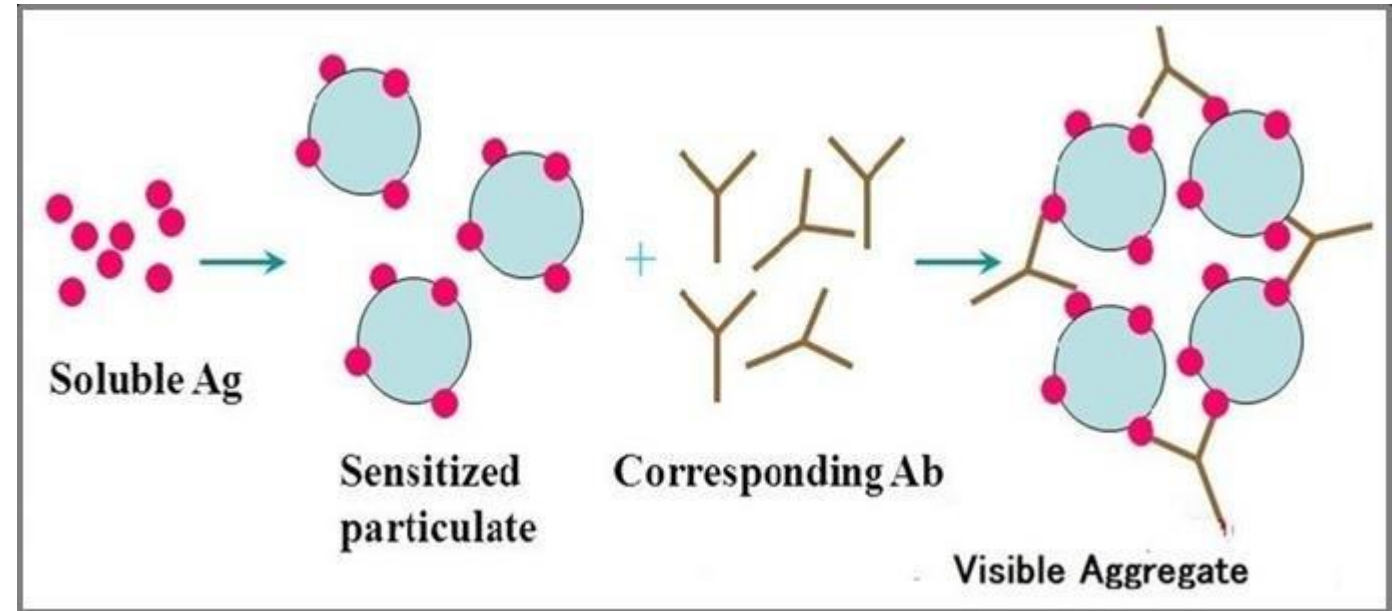


Tipos de testes de aglutinação

direta

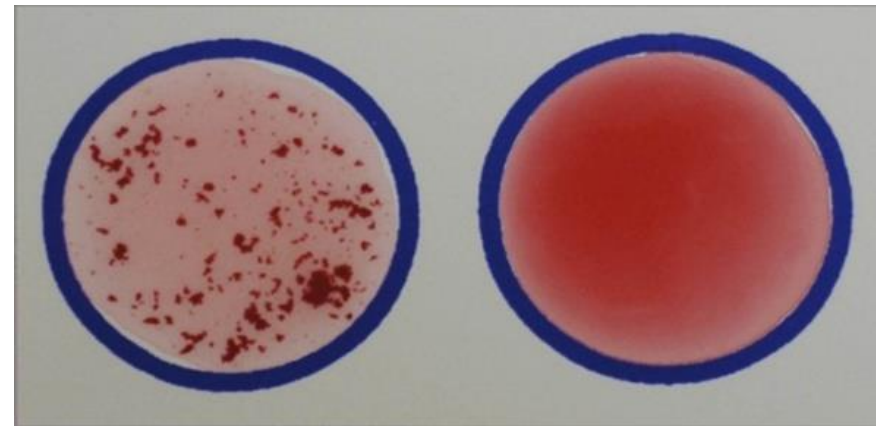


12



Positive Negative

Salmonella typhi



+

-

Staphylococcus aureus –
Proteína A e fator de
agregação

Requer menos de um minuto e não necessita de experiência prévia ou equipamentos

Imunofluorescência

Emprego de anticorpos contendo corantes fluorescentes conjugados para detecção de antígenos em células intactas

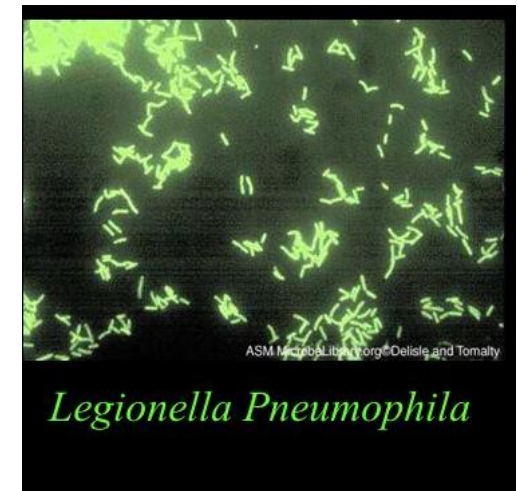
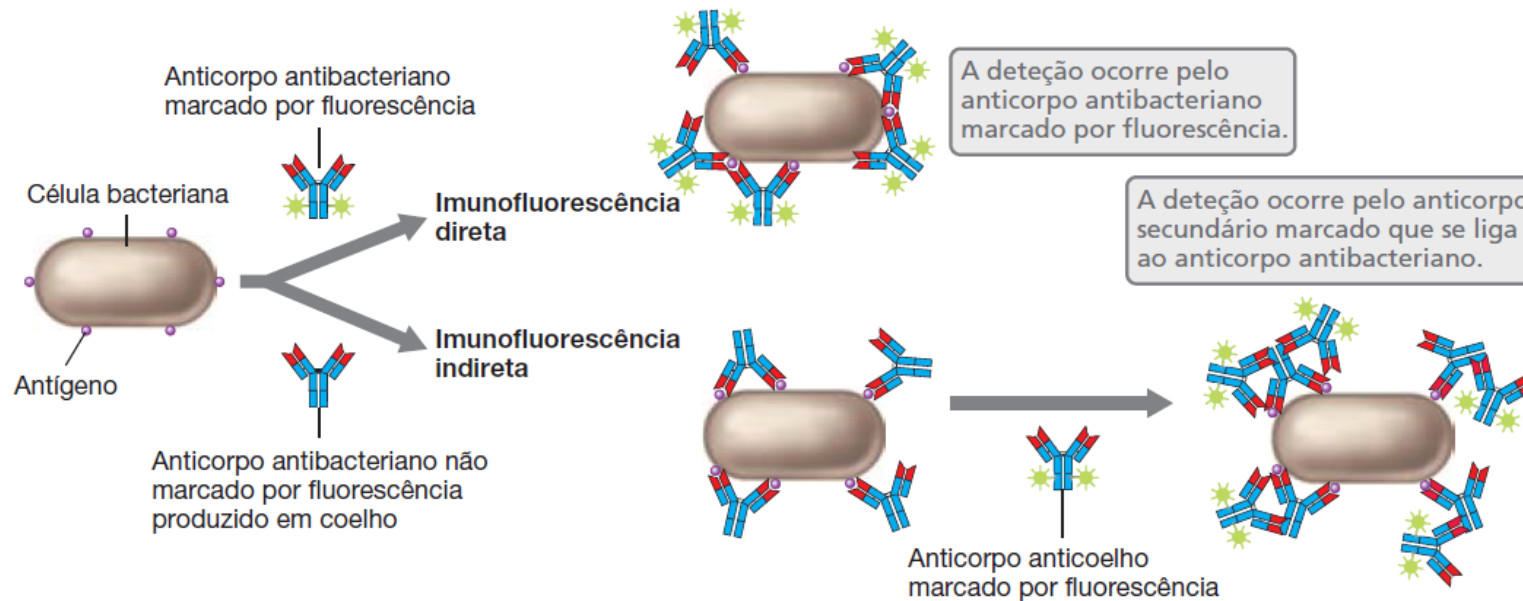
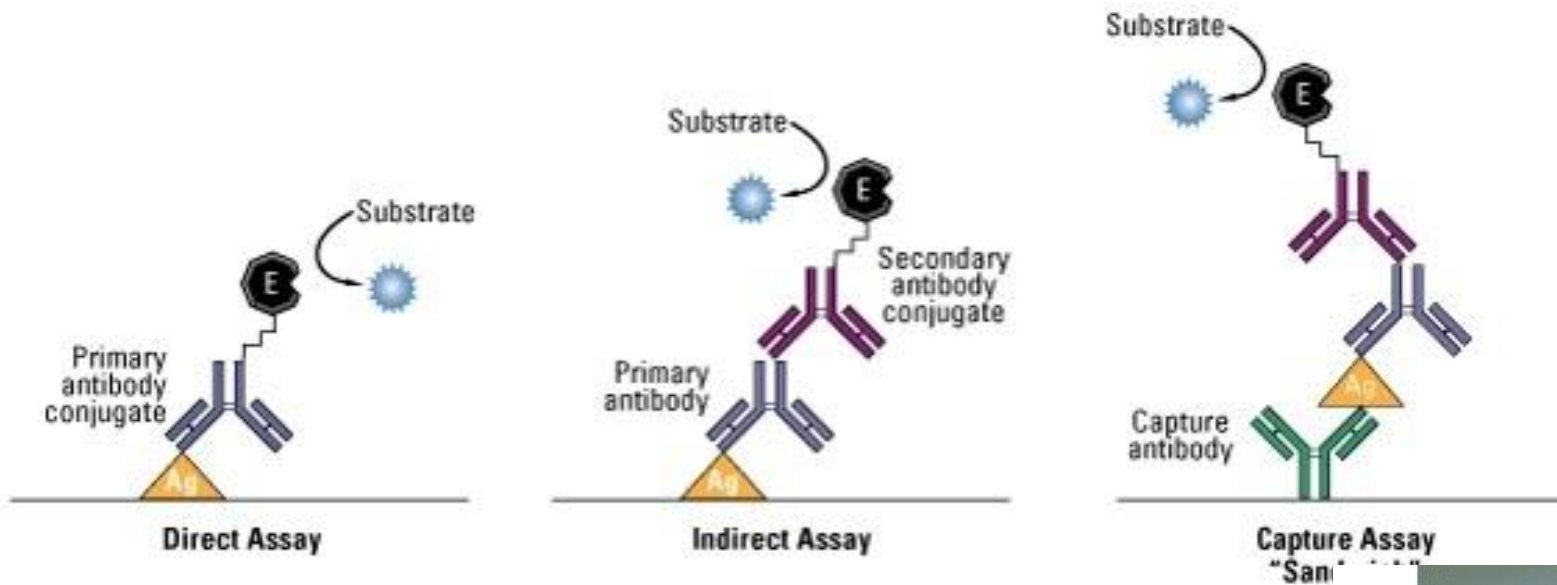
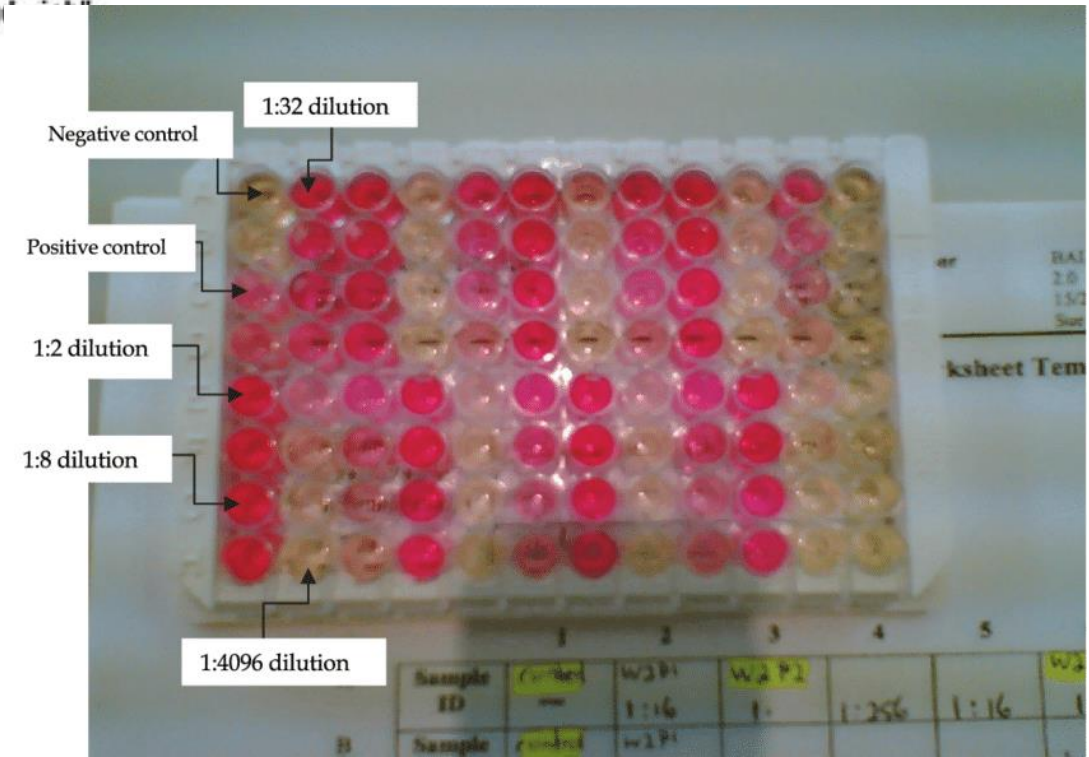


Figura 27.12 Métodos baseados em anticorpos fluorescentes para a detecção de antígenos de superfície microbianos. Note como a imunofluorescência indireta requer um anticorpo secundário marcado, que se liga ao anticorpo primário.

Ensaio imunoenzimático – ELISA ou EIA



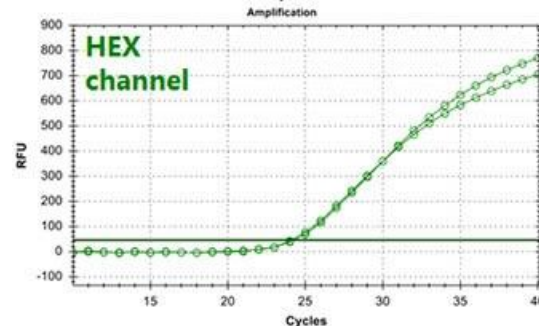
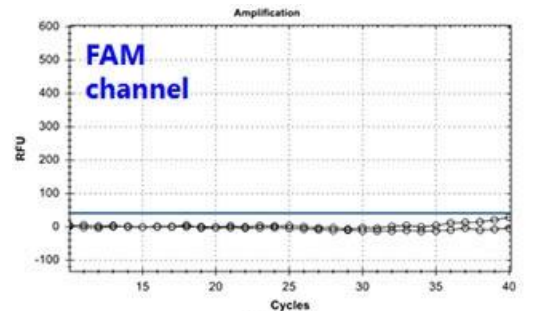
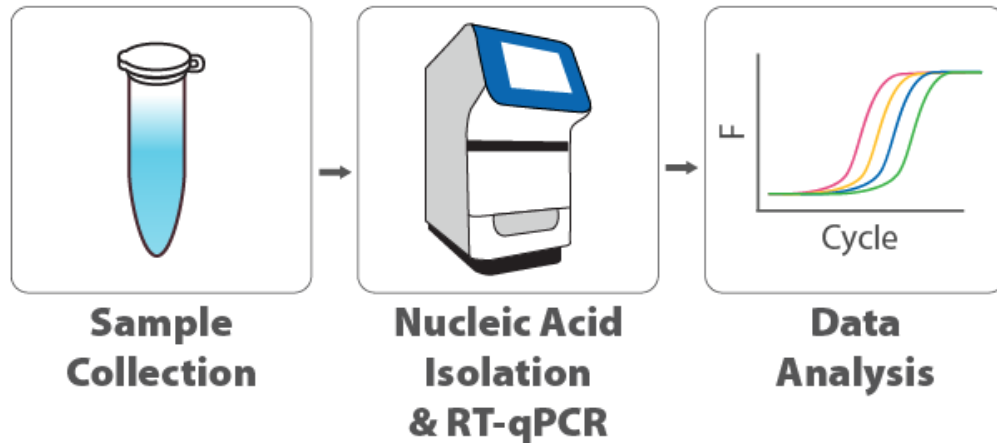
ELISA para *Salmonella*



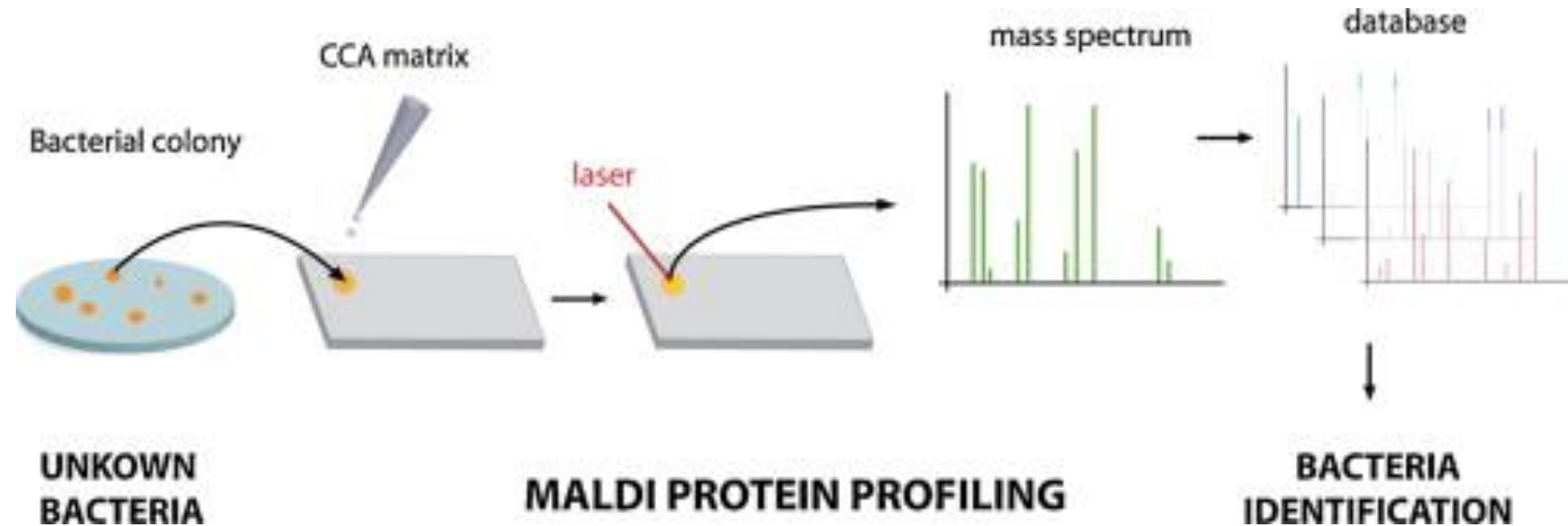
Testes baseado em ácidos nucleicos

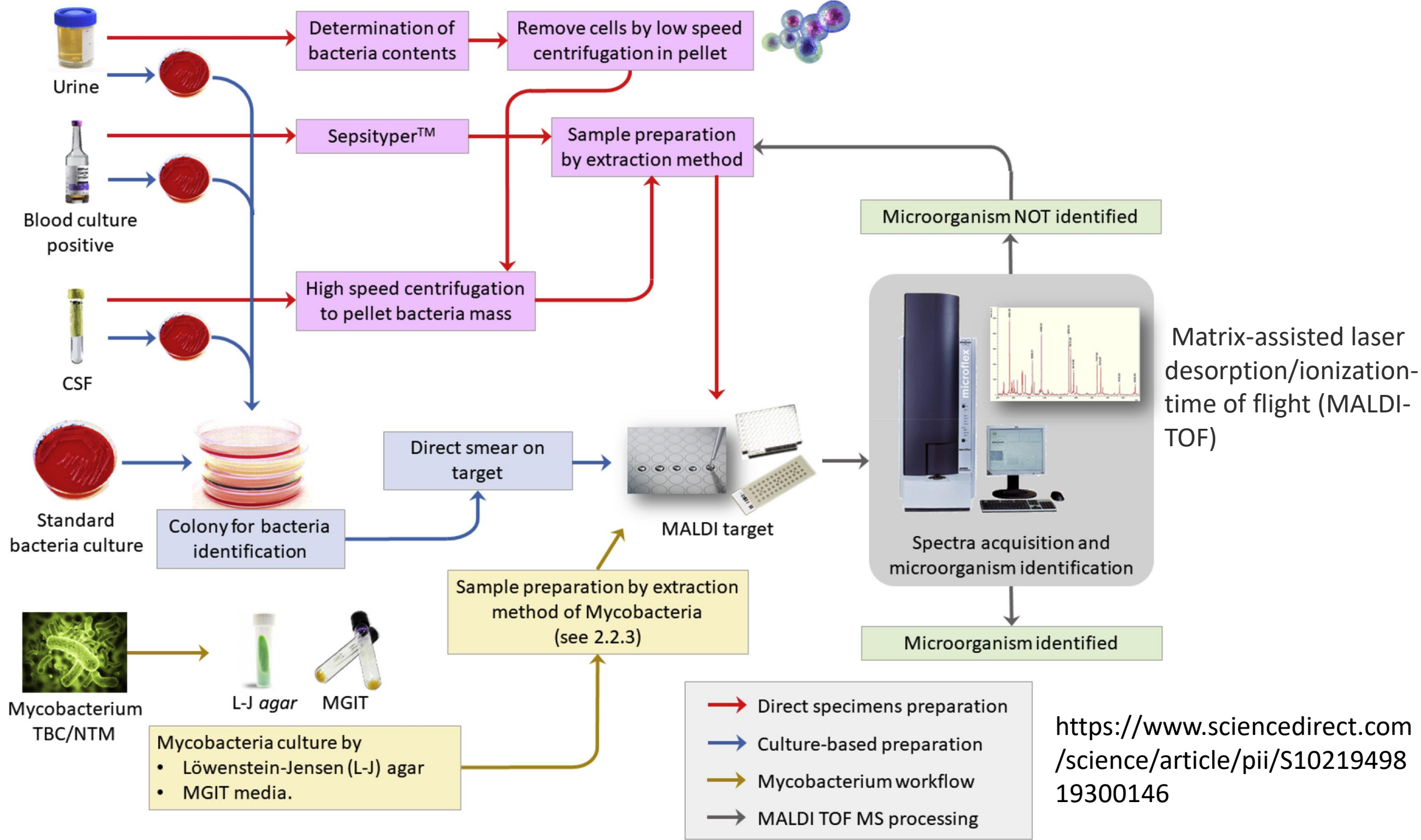
Ensaio de PCR e análise de dados

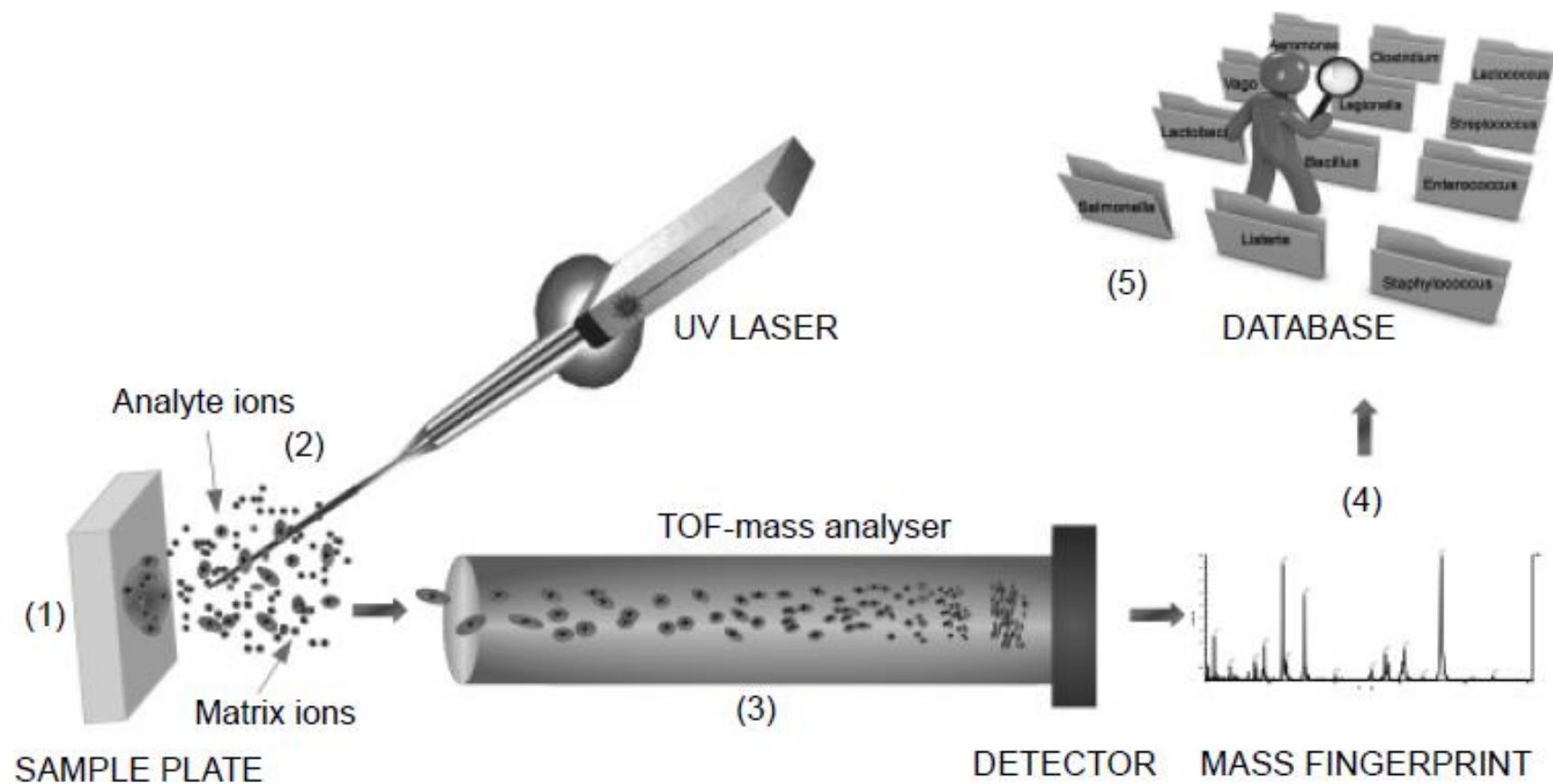
Podem ser patógeno específico – baseado



Diagnóstico de bactérias baseado em espectroscopia de massa







Perfil espectral de algumas bactérias

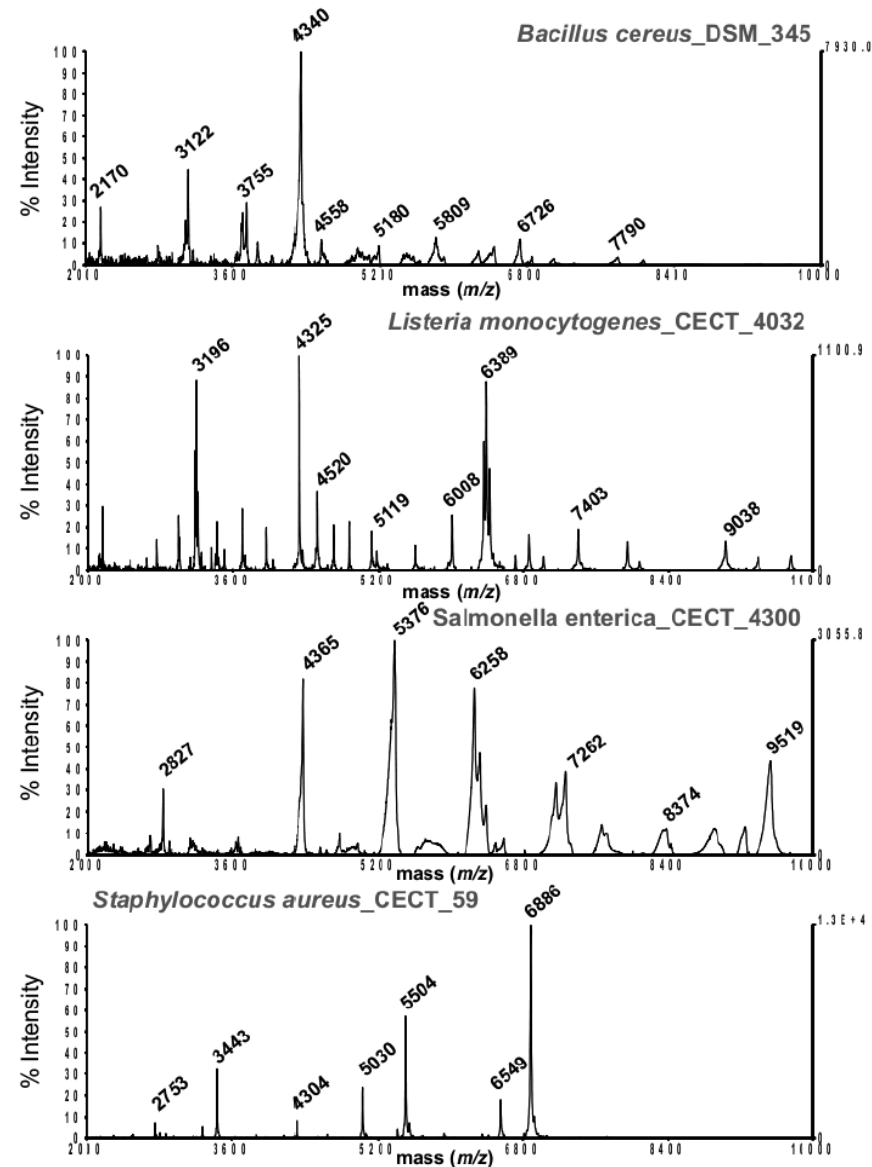


Figure 6. Spectral profiles of some important foodborne pathogens and food spoilers.

