

# **Relatório de Estágio**

## **Colheita em zaragatoa é suficiente para deteção de bactérias?**

**Joana Rita Protásio Valério**

Relatório de estágio para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador Interno: Prof. Doutora Isabel Gonçalves

Orientador Externo: Dra. Catarina Chaves

**outubro de 2023**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Joana Valério, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12091 do curso de Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 09/10/2023

joana Valerio



## Agradecimentos

Estes dois anos foram um desafio para mim, tanto pessoal como profissionalmente. Escolhi um caminho menos fácil, mas nem por isso o adorei menos, antes pelo contrário. Conheci pessoas maravilhosas que nunca pensei conhecer e que vou guardar para a vida. Sem elas não conseguiria chegar ao fim desta etapa, e por isso este cantinho fica dedicado a todas elas.

Primeiramente estou muito grata à Dra. Catarina Chaves por me ter aceitado ao seu lado neste estágio e me ter ensinado tanto e me ter ajudado e guiado neste percurso.

Quero agradecer também aos médicos internos que me acompanharam ao longo de vários meses, Dra. Margarida Peixinho, Dra. Filipa Freitas e Dr. Luís Roseta. Aprendemos muito juntos e nunca me negaram ajuda.

A toda a equipa do SPC pela paciência e ensinamentos.

À Professora Doutora Isabel Gonçalves que aceitou o desafio de ser minha orientadora apesar de não ser a sua área e me ajudou tanto.

Aos meus amigos por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos piores momentos e me ajudarem ao longo destes anos.

Ao meu namorado que sempre me apoiou nas minhas decisões e mesmo quando vim estudar para longe esteve sempre ao meu lado. Apesar da mudança nunca me deixou sozinha.

E claro à minha família por apoiar a minha decisão e me ajudar ao longo destes 2 anos.



## Resumo

No presente relatório de estágio são descritas as atividades realizadas durante os oito meses do estágio curricular realizado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Este estágio teve lugar no setor de Bacteriologia do Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica dos CHUC, com o objetivo de consolidar conhecimentos obtidos durante o mestrado e adquirir novos.

Para além do relatório de estágio, e alertando para um dos maiores problemas dos Laboratórios de Microbiologia, consta ainda nesta dissertação um pequeno projeto, baseado nas amostras recolhidas em zaragatoa e na recuperação dos microrganismos aí presentes, em meio *Cooked Meat*.

Neste projeto observou-se um maior número de amostras processadas com o auxílio do meio CM, representando mais de 50% do total das amostras. Isto indica que amostras em zaragatoa são suficientes para identificação de microrganismos desde que estas sejam inoculadas usando um meio de recuperação de microrganismos, como o *Cooked Meat*.

**Palavras-chave:** Bacteriologia, CHUC, Meio *Cooked Meat*, Microbiologia, Zaragatoa.



## **Abstract**

This internship report describes the activities carried out during the eight months of the curricular internship held at the Coimbra Hospital and University Center (CHUC), within the scope of the Master's Degree in Biomedical Sciences of the Faculty of Health Sciences of the University of Beira Interior.

This internship took place in the Bacteriology sector of the Microbiology Laboratory of the Clinical Pathology Service of the CHUC, with the aim of consolidating knowledge obtained during the master's degree and acquiring new ones.

In addition to the internship report, and alerting to one of the biggest problems of the Microbiology Laboratories, this dissertation also includes a small project, based on the samples collected in swabs and the recovery of the microorganisms present there, in Cooked Meat.

In this project, a greater number of samples were processed using CM medium, representing more than 50% of all samples. This indicates that swab samples are sufficient for identifying microorganisms as long as they are inoculated using a microorganism recovery medium, such as Cooked Meat.

**Keywords:** Bacteriology, CHUC, Cooked Meat, Microbiology, Swab.

## Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

# Índice

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Acrónimos</b>	<b>xvii</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>Parte I – Relatório de Estágio</b>	<b>3</b>
Caraterização do Serviço	<b>3</b>
Caraterização Estrutural	<b>4</b>
Sistema informático	<b>5</b>
Controlo de Qualidade Interna	<b>6</b>
Controlo de Qualidade Externa	<b>6</b>
Microbiologia Clínica	<b>6</b>
Fases do Total Processamento de Amostras	<b>7</b>
Setor de Bacteriologia	<b>9</b>
Coloração de Gram	<b>10</b>
Meios de Cultura	<b>11</b>
Técnicas de Sementeira	<b>17</b>
Espectrometria de Massa	<b>18</b>
Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	<b>19</b>
Colheita de Amostras em Zaragatoa	<b>21</b>
<b>Parte II – Colheita em zaragatoa é suficiente para deteção de bactérias?</b>	<b>24</b>
Materiais e Métodos	<b>24</b>
Resultados	<b>25</b>
<b>Conclusão</b>	<b>29</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>31</b>
<b>Apêndice</b>	<b>36</b>



## Lista de Figuras

Figura 1 - Organograma representativo do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, estando assinalado a laranja o local do estágio desenvolvido

Figura 2 - Mapa estrutural do Serviço de Patologia Clínica do Edifício São Jerónimo mostrando todos os setores presentes e a sua disposição

Figura 3 - Imagem representativa de uma observação ao microscópio de bactérias gram-negativo (esquerda) e de bactérias gram-positivo (direita)

Figura 4 - Representação dos tipos de hemólise que se podem observar na gelose de sangue: A - beta hemólise, B - alfa hemólise, C - gama hemólise [Fonte: Pearson Education, Benjamin Cummings]

Figura 5 - Meio líquido Cooked Meat

Figura 6 - Meio CLED, onde se pode observar organismos fermentadores de lactose (meio amarelo) e a zona sem crescimento (meio azul)

Figura 7 – Meio CDC com disco de metilmicina onde se consegue observar o halo sem crescimento

Figura 8 - Placa de Petri estriada usando o método de sementeira por esgotamento

Figura 9 - TSA manual: A - Método do gradiente antimicrobiano; B - Teste de difusão em disco

Figura 10 - Meio CM apresentando bastante purulência e bolhas de gás

Figura 11 - Gráfico representativo do tipo de amostras recolhidas

Figura 12 - Percentagem de amostras processadas com ou sem o auxílio do meio CM (Cooked Meat)



## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Amostras recolhidas no presente estudo

Tabela 2 - Amostras processadas com ou sem o auxílio do meio CM



## Lista de Acrónimos

CDC	<i>Anaerobe 5% Sheep Blood Agar</i>
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CLED	Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos
CM	Meio <i>CookedMeat</i>
CNA	Agar de Colistina e Ácido Nalidíxico
ESCMID	Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas
EUCAST	Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana
GS	Gelose de Sangue
HG	Hospital Geral
HP	Hospital Pediátrico
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matiz
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NE	<i>Anaerobe Neomycin 5% Sheep Blood Agar</i>
Schaedler K-V	Agar Schaedler com Canamicina e Vancomicina
SPC	Serviço de Patologia Clínica
TSA	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana



## Introdução

No âmbito do Estágio Curricular do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade da Beira Interior realizei um estágio no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

Este estágio teve como principais objetivos a aquisição de experiência prática e de competências científicas e técnicas relativas à microbiologia, assim como um pequeno estudo científico relativo às amostras recebidas em zaragatoa.

Durante todo o tempo de estágio estive integrada de forma ativa na rotina laboratorial e participei na interpretação de resultados relativos aos produtos recebidos na microbiologia.

Assim sendo, este relatório está dividido em duas partes: a primeira onde será descrito o local de estágio e os procedimentos aí realizados, e a segunda onde será abordado o estudo científico realizado. Neste estudo consegui concluir que apesar das amostras em zaragatoa não serem o ideal, com este tipo de colheita consegue recuperar os microrganismos presentes através do meio *Cooked Meat* e assim conseguir um diagnóstico correto.



## Parte I – Relatório de Estágio

### Caraterização do Serviço

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) faz parte do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

O SPC encontra-se dividido entre os laboratórios do edifício de São Jerónimo (laboratório central), o Hospital Pediátrico (HP) e o Hospital Geral (HG).

O estágio desenvolvido foi realizado no departamento de Microbiologia do edifício São Jerónimo, mais concretamente na Bacteriologia Geral, representado na Figura 1.

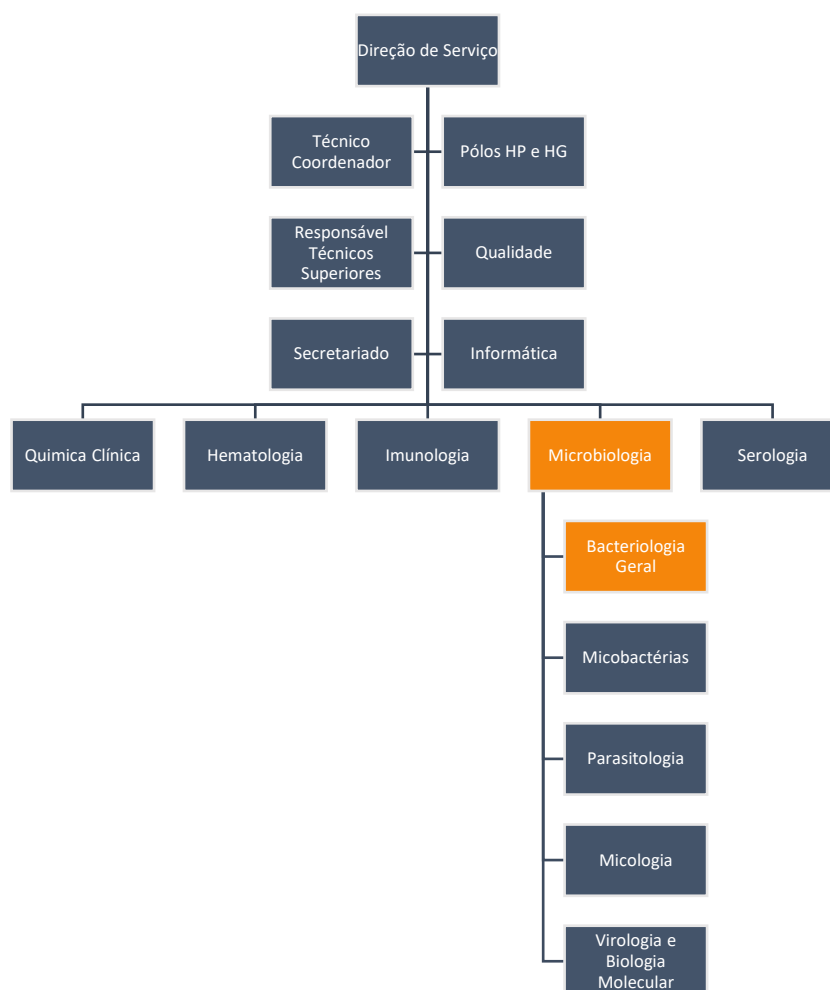


Figura 1 - Organograma representativo do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, estando assinalado a laranja o local do estágio desenvolvido

O SPC presta assistência aos diversos polos integrantes do CHUC, como o Hospital Universitário de Coimbra, Hospital Pediátrico, Hospital Geral, Hospital Sobral Cid, e também às maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos. Presta ainda assistência a diversas instituições particulares e públicas de todo o país, com as quais tem diferentes protocolos.

Este serviço apoia também a atividade formativa de diversos estudantes, sejam eles de Medicina ou de outra área da saúde, tanto de Coimbra como de outras partes do país.

Este, também colabora com vários projetos de investigação, tanto de dentro do Hospital como de outras entidades.

## **Caraterização Estrutural**

O laboratório principal está dividido em cinco áreas principais: Imunologia, Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Serologia. Para além destas secções, dispõe também de uma sala de colheitas e um de *Core Lab*. É no *Core Lab* que estão integrados os setores de Química e Hematologia.

A receção das amostras e a sua triagem faz-se no *Core Lab*, como observado na Figura 2. A única exceção são as amostras do setor da microbiologia que são encaminhadas para lá e são triadas no próprio setor.

Esta triagem é feita através da leitura ótica do código de barras, o que permite a sua integração informática e posterior acompanhamento das análises. Este código de barras começa com a letra correspondente ao setor de origem (M – microbiologia proveniente dos HUC; J – HP; C – HG; O – maternidades) e é seguida do número da amostra, que é constituído por seis números.

A secção laboratorial de Microbiologia engloba os laboratórios de Bacteriologia, de Parasitologia e de Micologia. O laboratório possui uma zona de receção e integração de amostras, zonas de processamento e análise das amostras, sala de microscopia, sala de refrigeração e estufas, sala de arrumos e salas de validação de dados.

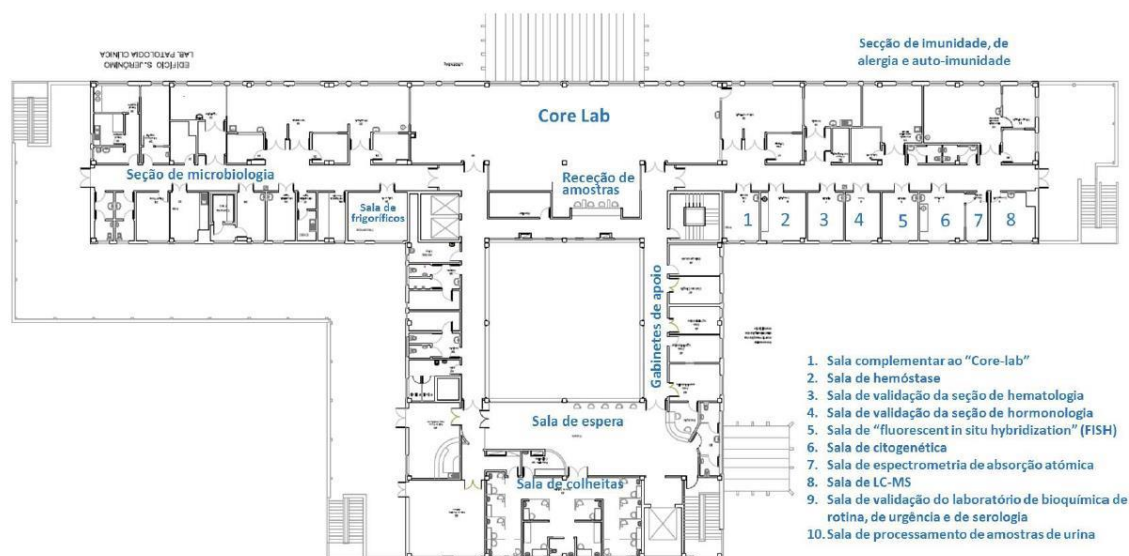


Figura 2 - Mapa estrutural do Serviço de Patologia Clínica do Edifício São Jerónimo mostrando todos os setores presentes e a sua disposição

## Sistema informático

O sistema informático do laboratório é o *ClinidataXXI*, que pertence a empresa portuguesa *Maxdata Software, S.A.*

Ao integrar uma amostra no sistema informático, os resultados ficam disponíveis para os clínicos, com hipótese de consulta nos diversos polos do CHUC. Fica também disponível todo o processo desse doente onde é possível ver o estado das amostras atuais, e também os resultados de amostras pedidas anteriormente.

No *ClinidataXXI*, também se encontram os dados do controlo de qualidade e os dados para fins estatísticos.

## **Controlo de Qualidade Interna**

O controlo de qualidade interna baseia-se no processamento periódico de amostras de concentração conhecidas (normalmente uma de valor normal, uma de valor mais baixo e outra de valor mais alto que o valor normal).

Também são efetuadas manutenções nos equipamentos, diariamente ou semanalmente, conforme o equipamento em questão, onde é feita a limpeza dos componentes e a sua calibração. No caso dos equipamentos de cadeia automatizada, estas manutenções são efetuadas por um profissional.

## **Controlo de Qualidade Externa**

O controlo de qualidade externa é realizado por programas certificados de avaliação externa de qualidade. Para isso, o laboratório recebe amostras conhecidas e desconhecidas e realiza os testes necessários para cada amostra. Depois, deve relatar quais os resultados que obteve em todas as amostras.

Mais tarde, os resultados submetidos são avaliados e comparados com os dos restantes laboratórios, podendo essa avaliação ser consultada e fazer-se algum tipo de calibração ou ajuste, conforme seja necessário.

## **Microbiologia Clínica**

A microbiologia clínica centra-se no isolamento e caracterização de organismos infecciosos a partir de amostras colhidas dos doentes em causa. Para diagnosticar uma infeção, uma amostra deve ser colhida do local anatómico onde a deteção de um agente patogénico é suscetível de significar doença [1].

As responsabilidades do laboratório de microbiologia clínica vão desde a caracterização do agente causador da infeção de um paciente, até ao envolvimento na deteção de surtos

globais de doenças. Estes processos estão a tornar-se cada vez mais complexos. Cada laboratório deve melhorar continuamente a qualidade para operar de forma mais eficiente [2].

## **Fases do Total Processamento de Amostras**

A prática laboratorial em microbiologia clínica, desde a recolha da amostra até à sua interpretação, pode ser dividida em três fases:

1. Pré-analítica: recolha, transporte e processamento de amostras
2. Analítica: testes laboratoriais
3. Pós-analítica: transmissão dos resultados dos testes, interpretação e acompanhamento

Estes três processos combinados são então chamados de "Total Processamento de Amostras" [3].

Todas as fases são fundamentais para se fazer o diagnóstico correto e, qualquer erro ao longo do processo, pode levar a resultados incorretos, com consequências no tratamento do doente [4], [5].

### Fase Pré-analítica

A fase pré-analítica do processo de exame engloba todas as etapas que ocorrem antes da amostra chegar ao laboratório de microbiologia. A maioria das atividades pré-analíticas ocorre fora das paredes do laboratório de microbiologia. Assim, é necessário o apoio institucional de forma a garantir boas práticas da parte dos grupos envolvidos, a fim de assegurar que a amostra seja recebida no laboratório com a máxima qualidade. Se esta estiver comprometida, a validade dos resultados fica comprometida [6].

A fase pré-analítica apresenta a maior taxa de erro. Estima-se que os erros pré-analíticos sejam responsáveis por cerca de 70% de todos os erros cometidos em diagnósticos

laboratoriais, a maioria dos quais decorre de problemas na preparação do paciente, colheita de amostras, transporte, preparação para análise e armazenamento [7].

O impacto do erro durante o processo de teste laboratorial pode obrigar a repetição da colheita, levar a diagnósticos errados e até a um tratamento inadequado [8]. Esses processos podem ser difíceis de controlar devido à complexidade e diversidade das decisões que são tomadas para colheita e transporte corretos. A escolha do teste adequado e uma colheita bem feita são fundamentais para um diagnóstico correto [6].

Um dos erros pré-analíticos mais frequentes consiste na seleção do teste laboratorial inapropriado, podendo levar a erros no diagnóstico.

O laboratório recebe, com frequência, pedidos de testes adicionais numa amostra já em análise. Isto torna-se um problema quando a amostra não é a adequada para o novo teste ou quando a quantidade de amostra não é suficiente para o mesmo. O laboratório tenta satisfazer o pedido, embora nem sempre seja possível, o que poderá atrasar o processo [9].

Todas as amostras têm de ser colhidas, identificadas e transportadas de acordo com o protocolo estabelecido, o qual inclui indicação do volume da amostra, o manuseamento da mesma e o tipo de contentor a usar. Se algum destes passos falhar, o processamento da amostra poderá fracassar a na fase analítica: a amostra pode não ser a correta para aquele tipo de teste, a colheita pode ter sido realizada incorretamente o contentor inadequado ou contaminado pode não preservar a amostra ou pode mesmo degradá-la. Isto leva, mais uma vez, ao adiamento do estado do doente [9].

O transporte é também muito importante. Se, por exemplo, as amostras forem expostas ao sol, estas podem tornar-se inviáveis o que pode levar a resultados erróneos. Além disso, se o recipiente que contem a amostra vier com algum tipo de fuga, esta não poderá ser processada, pois pode colocar em risco os técnicos que a manusearem [9].

### Fase Analítica

A fase analítica laboratorial é, sem dúvida, o setor com melhor desempenho na área da saúde. Dado o alto volume de exames laboratoriais realizados, esta fase é a que apresenta a taxa mais baixa de erros, rondando os 13% a 32% de todos os erros ocorridos no total processamento de amostras [8]. De referir que, dentro dos erros ocorridos, os mais

comuns são o mau funcionamento de equipamentos, troca de amostras, falha não detetada no controlo de qualidade [10].

### Fase Pós-analítica

A fase pós-analítica consiste nos processos que se seguem ao exame (que incluem a revisão dos resultados) [11], e representam de 19% a 47% dos erros totais [8]. Um desses erros, e um dos mais comuns, é a demora no envio do resultado laboratorial para o clínico, e que pode causar reclamações ao laboratório. Atrasos em qualquer fase do processo total de teste podem levar a demoras e atraso no tratamento do doente [12].

A qualidade dos comentários interpretativos também são uma fonte de erro pós-analítico. A forma como o médico interpreta os resultados pode ser um erro potencial, tal como informações incorretas sobre o paciente no formulário de solicitação (um erro pré-analítico) podem levar a comentários interpretativos incorretos (um erro pós-analítico) [12].

## **Setor de Bacteriologia**

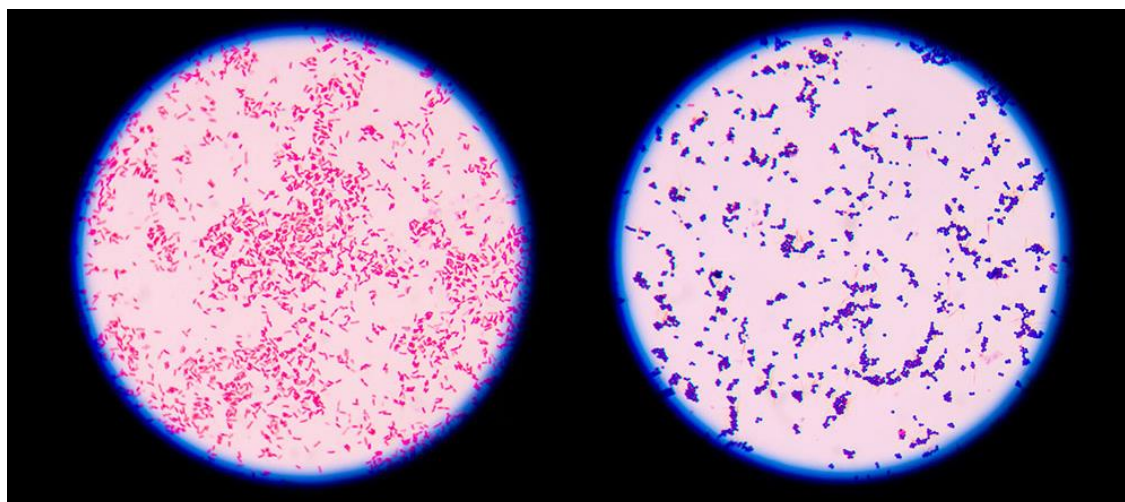
Neste setor o procedimento laboratorial inicia-se com o recebimento e integração da amostra no laboratório. De seguida faz-se a sementeira no meio indicado e um exame direto através da coloração de Gram. Faz-se a sua observação microscópica e, após incubação, a avaliação da cultura, isolamento de colónias e a identificação por espetrometria de massa. Por último, realiza-se o teste de suscetibilidade antimicrobiana. À medida que se obtêm os resultados, estes são reportados no sistema informático.

## Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma das técnicas de coloração mais importantes em microbiologia, pois permite uma avaliação rápida da morfologia do agente patogênico em análise. Esta metodologia permite distinguir bactérias gram-positivo de gram-negativo, com base na coloração diferencial com um complexo cristal violeta e uma contra coloração de safranina. A coloração de Gram continua a ser uma das colorações mais importantes na caracterização e classificação inicial das bactérias [13].

Após coloração Gram, as bactérias ficam coradas de rosa ou roxo, como se pode observar na Figura 3, e isso permite a classificação das bactérias com base na sua composição da parede celular respectivamente em gram-negativo ou gram-positivo. Os organismos gram-positivo têm maior teor de peptidoglicanos, enquanto os microrganismos gram-negativo têm maior teor de lipídios [14].

A retenção da coloração cristal violeta pelas bactérias gram-positivo é atribuída à presença de uma espessa camada de peptidoglicano na sua parede celular. Essa camada retém o corante mesmo após a etapa de descoloração, onde é utilizado álcool para retirar o excesso de corante da amostra. Por outro lado, as bactérias gram-negativo não retêm a coloração do cristal violeta devido à presença de uma membrana externa que é degradada pelo álcool, resultando numa parede celular porosa incapaz de reter o corante. Assim, as bactérias gram-negativo vão absorver uma contra coloração de safranina e aparecem com uma coloração rosa [15].



*Figura 3 - Imagem representativa de uma observação ao microscópio de bactérias gram-negativo (esquerda) e de bactérias gram-positivo (direita)*

O esfregaço da amostra biológica corado pelo método Gram fornece informações ao clínico sobre a presença de certos agentes patogénicos, assim como também orienta os clínicos nos próximos passos a tomar na cultura [16].

Este é um exemplo de um teste de microbiologia que requer interpretação pelo clínico que solicitou a análise. O processo de execução da coloração de Gram pode ser realizado de forma manual ou automatizada. No caso do SPC esta técnica é realizada de forma automatizada. Na câmara de fluxo laminar, é feito um esfregaço da amostra, na lâmina de vidro, com a ajuda de uma ansa descartável, e deixa-se secar ao ar. Antes da coloração, estas são passadas à chama para fixar o esfregaço à lâmina.

O maior desafio desta técnica continua a ser interpretar e relatar, com precisão, o que é observado na coloração de Gram. Isso pode ser complicado por uma série de variáveis, como a qualidade da amostra, o método de fixação, a viabilidade do organismo e as variações inerentes na coloração dos organismos presentes na amostra [17].

A eficácia da coloração de Gram como ferramenta diagnóstica depende da confiança dos clínicos na qualidade do resultado e dos passos a seguir mediante o resultado, como alternativa a e esperar pela cultura. No SPC, este resultado é muito importante pois é analisada antes de se fazerem as culturas. Isto torna-se uma vantagem na hora de interpretação de placas de cultura, uma vez que o clínico já tem uma ideia do que pode encontrar e que passos deve seguir mediante o resultado.

## **Meios de Cultura**

Os meios de cultura não seletivos, não contêm inibidores, e devem permitir o crescimento da maioria dos microrganismos presentes nas amostras clínicas em estudo [18].

Os meios enriquecidos são utilizados para facilitar o crescimento de microrganismos fastidiosos. O principal componente de enriquecimento é o sangue, que fornece vários nutrientes para o crescimento destes microrganismos [18].

A presença de crescimento bacteriano geralmente pode ser reconhecida pelo desenvolvimento de colónias em meio sólido, ou turbidez em meio líquido [19].

O sangue é usado como um suplemento nutricional essencial em meios de cultura microbiológicos, particularmente para cultura e isolamento de microrganismos fastidiosos para o diagnóstico de infecções bacterianas graves [20].

No SPC já está estabelecido um protocolo que refere os meios a serem utilizados para os diferentes tipos de amostras. No caso das amostras com que mais trabalhei (exsudatos de feridas, biopsias, pus de abcesso, entre outros), os meios iniciais a serem utilizados são a Gelose de Sangue (GS) e, no caso de ser necessário um meio líquido, o *CookedMeat* (CM). Os meios são adquiridos já nas placas de Petri, prontos a utilizar, e são armazenados até à sua utilização.

Após a análise destes resultados iniciais, o clínico pode solicitar repicagem para meios mais específicos, conforme as colónias que observa nas placas ou a turbidez do meio líquido.

### Gelose de Sangue

Gelose de Sangue (GS), é um meio de agar com a adição de sangue estéril, e é usado para o isolamento, cultura e deteção da atividade hemolítica de *Streptococcus* e outros microrganismos fastidiosos. A suplementação com sangue (5-10%) fornece fatores de crescimento adicionais para microrganismos fastidiosos, e é a base para determinar reações hemolíticas [21].

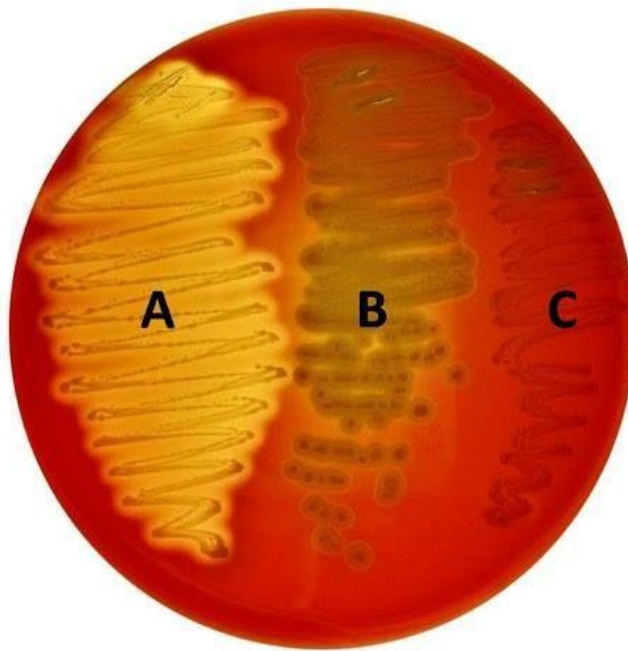
Estas reações caracterizam-se pela hemólise, ou seja, rotura da membrana dos glóbulos vermelhos, pela hemolisina. As reações hemolíticas são muito úteis para conseguir identificar microrganismos, pois muitas vezes estes têm um aspeto semelhante, mas produzem uma reação hemolítica distinta, e assim consegue-se saber qual o agente patogénico presente.

Existem 3 tipos de reações hemolíticas que podem ser observadas: alfa, beta e gama. As diferenças entre elas podem ser observadas na Figura 4.

A beta hemólise ( $\beta$ ) é definida como lise completa ou verdadeira dos glóbulos vermelhos. Uma zona clara, aproximando-se da cor e transparência do meio base, rodeia a colónia (Figura 4 A).

A alfa hemólise ( $\alpha$ ) é a redução da hemoglobina dos glóbulos vermelhos para metahemoglobina no meio que envolve a colónia. Isso causa uma descoloração verde ou acastanhada no meio. A inspeção microscópica dos glóbulos vermelhos alfa hemolisados mostra que a membrana celular está intacta, portanto, não é, de facto, lise verdadeira. Alguns autores de livros didáticos referem-se ao alfa como "hemólise parcial" (Figura 4 B).

A gama hemólise ( $\gamma$ ) é um tanto contraditória pois esta indica a falta de hemólise. Não deve haver reação no meio circundante (Figura 4 C) [22].



*Figura 4 - Representação dos tipos de hemólise que se podem observar na gelose de sangue: A - beta hemólise, B - alfa hemólise, C - gama hemólise [Fonte: Pearson Education, Benjamin Cummings]*

### Cooked Meat (CM)

O meio CM é um meio líquido que fornece um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos anaeróbios, uma vez que a proteína muscular nos grânulos do tecido cardíaco é uma fonte de aminoácidos e outros nutrientes, como se pode observar na Figura 5. O tecido muscular também fornece substâncias redutoras, particularmente glutatona, que permite o crescimento de anaeróbios estritos.

O crescimento é indicado pela turbidez e, com alguns organismos, pela presença de bolhas de gás no meio.

O meio também é útil como caldo de enriquecimento para a cultura de bactérias anaeróbias [21].



Figura 5 - Meio líquido Cooked Meat

### CLED

O meio CLED (Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos) é um meio de cultura para diferenciação, utilizado no isolamento e enumeração de bactérias. É adequado para o isolamento e contagem de muitos microrganismos de crescimento aeróbio. Este meio suporta o crescimento de agentes patogênicos, mas evita a proliferação indevida de espécies de *Proteus* devido a ausência de eletrólitos.

Os nutrientes presentes no CLED são fornecidos pelas peptonas de caseínas e gelatina e extrato de carne de vaca. Além disso, também possui lactose na sua composição, pois esta fornece uma fonte de energia para os organismos com capacidade de a utilizarem num mecanismo fermentativo. É utilizado o azul de bromotimol como um indicador de pH para diferenciar os fermentadores da lactose dos não fermentadores da lactose. Os organismos que fermentam a lactose irão reduzir o pH e alterar a cor do meio de azul para amarelo [23], como se pode observar na Figura 6.

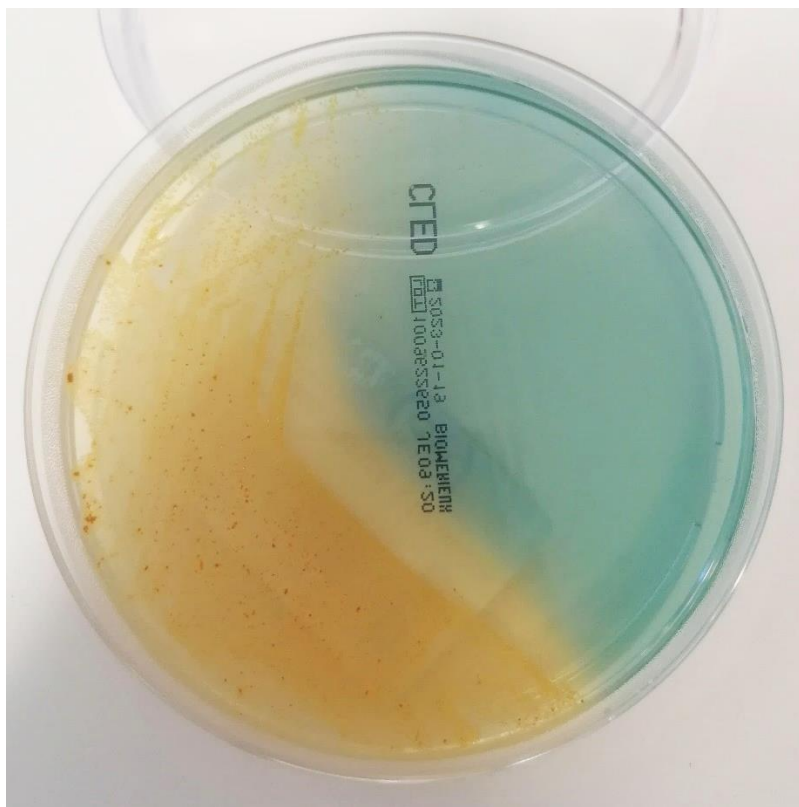


Figura 6 - Meio CLED, onde se pode observar organismos fermentadores de lactose (meio amarelo) e a zona sem crescimento (meio azul)

### CNA

O meio CNA agar (colistina + ácido nalidíxico) é constituído por 5% de sangue de ovelha desfibrinado, utilizado para a cultura de cocos gram-positivo de amostras biológicas complexas. Este meio seletivo inibe a maioria das bactérias gram-negativo e permite o crescimento de *Staphylococcus* e *Streptococcus* [24].

A seletividade deste meio baseia-se na presença de CNA, uma mistura dos antibióticos colistina e ácido nalidíxico, a qual inibe o crescimento das bactérias gram-negativo. A colistina perturba a membrana celular dos organismos gram-negativo, enquanto o ácido nalidíxico bloqueia a replicação do DNA em bactérias gram-negativo suscetíveis. O crescimento da maioria das bactérias gram-positivo é promovido pelos nutrientes e pelo sangue presente no meio [25].

### CDC com disco de netilmicina

CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar é usado para o isolamento e cultura de bactérias fastidiosas e de crescimento lento, obrigatoriamente anaeróbias. Também suporta um bom crescimento da maioria das bactérias aeróbias, facultativamente anaeróbias e microaerofílicas, se incubadas adequadamente [21].

A adição do disco de netilmicina serve para observar se realmente há crescimento de microrganismos anaeróbios, uma vez que estes são resistentes a este antibiótico. Assim, caso se observe um halo em volta do disco isso indica que não existe crescimento de anaeróbios, como se pode observar pela Figura 7. Pelo contrário, quando esse halo não está presente, existem microrganismos anaeróbios.



*Figura 7 – Meio CDC com disco de metilmicina onde se consegue observar o halo sem crescimento*

### Schaedler K-V

O Agar Schaedler é uma base para várias formulações de meios utilizados para a recuperação de microrganismos anaeróbios. A sua composição contém vitamina K1 e 5% de sangue de ovelha que é usado para o isolamento e cultura de aeróbios fastidiosos e

anaeróbios. À composição base ainda é adicionado canamicina (K) e vancomicina (V), que são especialmente úteis no isolamento seletivo de espécies de *Bacteroides* e *Prevotella*.

A adição dos agentes antimicrobianos canamicina e vancomicina no meio ágar torna o meio seletivo para microrganismos gram-negativo. A canamicina inibe a síntese proteica em organismos suscetíveis, enquanto a vancomicina inibe as bactérias gram-positivo, interferindo na síntese da parede celular [21].

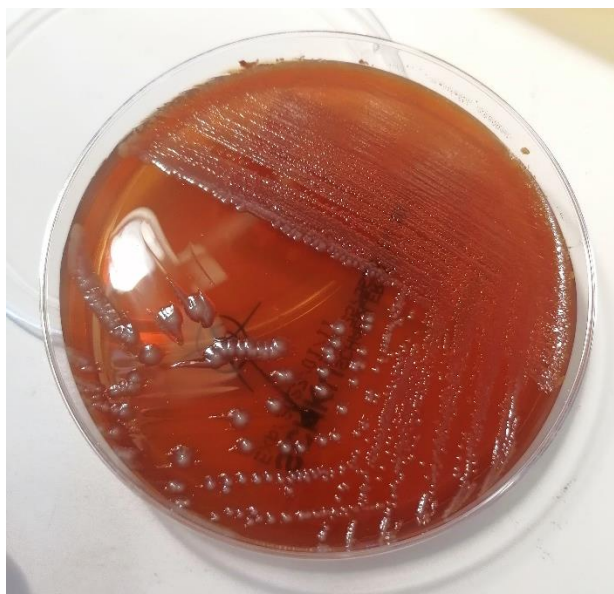
## NE

O *Anaerobe Neomycin 5% Sheep Blood Agar* é um meio seletivo utilizado para o isolamento e cultura de bactérias anaeróbias obrigatórias fastidiosas e de crescimento lento.

Este meio consiste em *CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar* e o agente seletivo, neomicina (NE). O uso de um agente antimicrobiano melhora a recuperação de bactérias obrigatoriamente anaeróbias de espécimes contendo flora mista [21].

## **Técnica de Sementeira**

O método utilizado no SPC é a sementeira por esgotamento. É colocado um pouco da amostra na placa de Petri e, com a ajuda de uma ansa descartável, espalha-se a amostra, em quadrantes, por toda a placa. Desta forma os microrganismos presentes são sucessivamente diluídos à medida que cada quadrante é estriado, com o objetivo de obter colónias isoladas [26]. Este fenómeno consegue-se observar na Figura 8, onde se percebe que foram usados quatro quadrantes e que há medida que a amostra é diluída, vão se observando colónias isoladas.



*Figura 8 - Placa de Petri estriada usando o método de sementeira por esgotamento*

## **Espectrometria de Massa**

A identificação de microrganismos por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é um método de identificação microbiana, por espectrometria de massa (MS), que pode identificar com precisão uma grande variedade de patógenos, como bactérias, leveduras, fungos filamentosos e micobactérias em apenas alguns minutos [27].

É um dos métodos de MS mais utilizados para a identificação de microrganismos em amostras biológicas. Identificar microrganismos usando MALDI-TOF MS é conveniente, rápido e preciso, além de ser rentável [28].

Após existirem colônias isoladas formadas no meio de cultura, passa-se então à sua identificação usando o MALDI-TOF MS. Cada colônia é colocada num espaço da matriz (lâmina com vários locais com ácido forte). Cada local tem uma identificação de posição que fica associado ao número da amostra. Após secagem da lâmina à temperatura ambiente, durante alguns minutos, esta é colocada no equipamento.

A matriz é ionizada, com um laser, e transfere a carga para os analitos, gerando íões carregados individualmente a partir dos analitos na amostra que são então acelerados. Os íões são separados uns dos outros com base na sua relação massa/carga ( $m/z$ ) antes de serem detetados e medidos utilizando o analisador de massa TOF [29].

O equipamento usado no SPC é o MALDI Biotyper® (MBT) da Bruker. Este método microbiológico, baseado na impressão digital proteômica única de um microrganismo, permite identificação rapidamente. Padrões proteômicos de microrganismos desconhecidos, adquiridos por MALDI-TOF MS, são comparados com uma extensa biblioteca de referência, pronta para uso, que abrange milhares de espécies [30].

Ao fazer-se esta comparação, o equipamento fornece um score de percentagem de semelhança entre o microrganismo identificado e os microrganismos presentes na biblioteca de referência [31].

## **Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos**

A gestão de agentes antimicrobianos é um instrumento fundamental para melhorar a utilização de dados microbiológicos, a fim de facilitar a utilização adequada de agentes antimicrobianos e, por conseguinte, minimizar a resistência antimicrobiana, bem como outras consequências indesejadas, como a toxicidade antimicrobiana e as reações adversas a medicamentos [32].

As causas da resistência antimicrobiana são complexas e multifacetadas. Assim, o teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) torna-se uma tarefa diária bastante relevante em laboratórios de microbiologia clínica. Com isto, é cada vez mais importante a interpretação correta destes testes, uma vez que a gestão de antimicrobianos é uma das principais estratégias para combater a sua resistência [33], [34].

Em 1997, a Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas (ESCMID) formou o Comité Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) com a intenção de atuar como um comité europeu de *breakpoint*. A EUCAST foi encarregue de harmonizar os pontos de interrupção da MIC (Concentração Inibitória Mínima) em toda a Europa e de recomendar metodologias de referência comuns [35]. A MIC é definida como a menor concentração de fármacos que inibe o crescimento visível de um microrganismo, após uma determinada incubação [36].

Recentemente, fez-se a introdução de novas definições EUCAST das categorias S, I e R: S, suscetível, regime de dosagem normal. Um microrganismo é classificado como "suscetível, regime de dosagem normal" quando existe uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico utilizando um regime de dosagem normal do agente.

I, suscetível, exposição aumentada. Um microrganismo é classificado como "suscetível, exposição aumentada" quando existe uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição ao agente é aumentada pelo ajuste da dose ou pela sua concentração no local da infecção.

R, Resistente. Um microrganismo é classificado como "resistente" quando há uma alta probabilidade de falha terapêutica, mesmo quando há maior exposição [35].

Atualmente, no laboratório de SPC, os TSAs são realizados de duas formas diferentes: de forma automatizada, através do *MicroScan WalkAway* (Beckman Coulter) ou de forma manual através do Método do gradiente antimicrobiano e do Teste de difusão em disco.

O TSA manual é realizado utilizando-se os dois métodos acima mencionados. O método de difusão do gradiente antimicrobiano utiliza tiras de teste de plástico, finas, que estão impregnadas na parte inferior com um gradiente de concentração de antibiótico seco. Na parte superior estão marcadas com uma escala de concentração. O microrganismo é inoculado numa placa de Petri, com meio agar, e as tiras são colocadas por cima (normalmente duas por placa). As placas são incubadas de um dia para o outro e são lidos os resultados. Para isso, observam-se as tiras de teste e a MIC é determinado pela interseção do crescimento microbiano com a tira de ensaio (Figura 9 A). O teste de difusão em disco funciona de forma semelhante ao método anterior. Discos de antibióticos, preparados comercialmente, são colocados na superfície do agar inoculado. As zonas de inibição do crescimento em torno de cada um dos discos de antibióticos são medidas ao milímetro mais próximo (Figura 9 B). O diâmetro da zona sem crescimento está relacionado com a suscetibilidade do isolado e com a taxa de difusão da droga através do meio agar. Os resultados do teste de difusão em disco são classificados como S, I ou R [37].

Para o TSA automatizado, é utilizado o *MicroScan WalkAway* que é um grande dispositivo de incubação que pode analisar de 40 a 96 bandejas de microdiluição. O *WalkAway* utiliza bandejas de microdiluição de tamanho padrão que são hidratadas e inoculadas manualmente e, em seguida, colocadas num dos *slots* da incubadora no equipamento. Os resultados vão diretamente para o sistema informático, facilitando assim a sua validação [37].

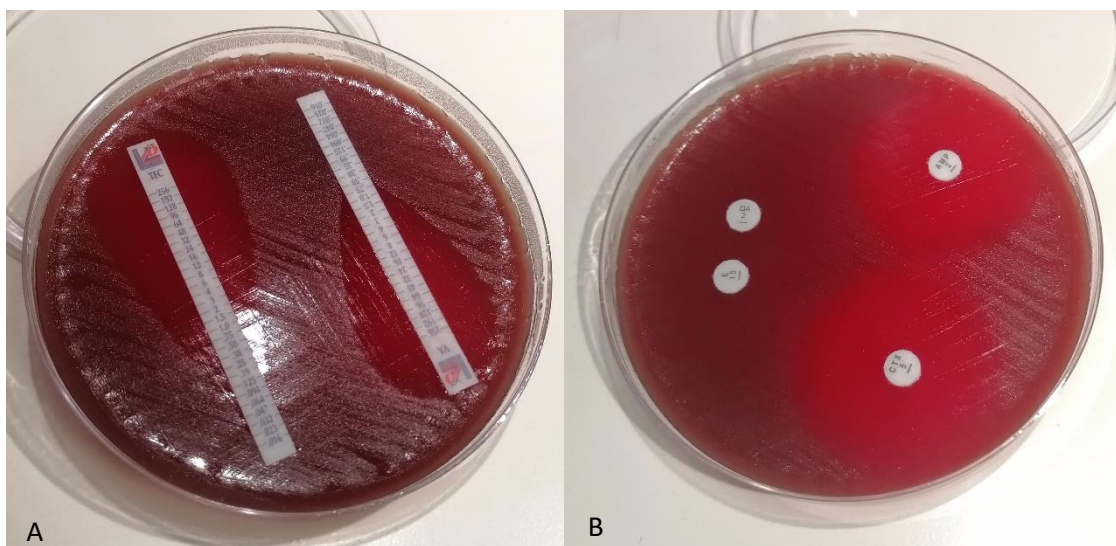


Figura 9 - TSA manual: A - Método do gradiente antimicrobiano; B - Teste de difusão em disco

## Colheita de Amostras em Zaragatoa

A colheita de uma amostra em microbiologia clínica é de extrema importância. A qualidade da amostra determina a qualidade dos resultados. A colheita adequada de espécimes consiste na colheita adequada da amostra, na seleção adequada do recipiente, e nas condições de transporte adequadas. A equipa do laboratório de microbiologia é composta por técnicos e clínicos que são minuciosamente treinados sobre as metodologias adequadas de processamento e teste. No entanto, mesmo os profissionais mais qualificados e as melhores práticas laboratoriais podem não compensar uma amostra pobre. Embora as amostras colhidas indevidamente levem a resultados não fiáveis, estas são recebidas diariamente no laboratório de microbiologia. Assim, é função do laboratório transmitir informações sobre técnicas de colheita e recipientes adequados a todos os profissionais envolvidos [38].

Durante a colheita de amostras para cultura, a superfície a partir da qual a amostra é obtida deve ser cuidadosamente limpa. A limpeza inadequada resultará na amostragem da microbiota superficial contaminante. Estes organismos colonizadores podem crescer em excesso nas placas de cultura, obscurecendo ou impedindo o crescimento de verdadeiros patógenos bacterianos subjacentes e reduzindo a sensibilidade dos resultados da cultura [39].

Em geral para todos os testes de cultura de microbiologia, aspirados, fluidos e amostras de tecido, são preferidos em relação às zaragatoas, devido ao seu maior rendimento. No entanto, nem sempre é possível obter um aspirado, fluido ou tecido, sendo as zaragatoas comumente aceites. A desinfecção do local (se aplicável) deve ser cuidadosamente considerada durante a colheita da amostra [38].

Recomenda-se a limpeza da ferida com soluto estéril (soro fisiológico ou água destilada estéril). Antes da colheita, deve-se proceder à remoção de tecido desvitalizado, se for o caso. Caso não seja possível aspirar o exsudato então colhe-se das paredes da ferida com zaragatoa e envia-se para o laboratório [40].

O uso de zaragatoas para a colheita de amostras é de pouco valor e deve ser desencorajado por dois motivos principais: as zaragatoas estão associadas a um risco maior de contaminação com microrganismos superficiais e têm uma capacidade de volume limitada [19].



## Parte II – Colheita em zaragatoa é suficiente para detecção de bactérias?

### Materiais e Métodos

As amostras são triadas quando chegam ao laboratório de microbiologia e, conforme o produto, são impressas etiquetas que serão colocadas nos respectivos meios de cultura a ser utilizados. Serão utilizados meios diferentes para conseguir fazer crescer determinados microrganismos. Os produtos são levados para a câmara de fluxo laminar, juntamente com os meios necessários.

Quando os produtos chegam em zaragatoa, esta é esfregada no meio de gelose de sangue e, com a ajuda de uma ansa descartável, fazem-se estrias pela placa, utilizando o método de esgotamento. Também se espalha um pouco numa lâmina de vidro, para uma coloração de Gram. No final, a zaragatoa será colocada em meio líquido de enriquecimento, *Cooked Meat*. Após a inoculação, os meios de cultura são incubados a 37°C e são observados após incubação (12h a 18h, incubação *overnight*). Preferencialmente, os Gram são observados, antes dos meios de cultura pois auxiliam na identificação dos microrganismos.

Visualiza-se o meio de gelose de sangue para verificar se há ou não crescimento de microrganismos e sua identificação. Caso a cultura não esteja pura, faz-se uma repicagem para meio novo, a partir de uma colónia isolada. Uma vez isolado, faz-se a sua identificação, através do MALDI-TOF MS e posterior TSA.

No *Cooked Meat* verifica-se se o líquido está turvo ou se está translúcido. A turbidez é sinal de que houve crescimento microbiano e nesse caso repica-se para um meio sólido, para analisar o tipo de microrganismos presentes, como se pode observar na Figura 10.



Figura 10 - Meio CM apresentando bastante purulência e bolhas de gás

Ainda no meio líquido, podem-se observar bolhas de gás, o que indica o crescimento de microrganismos anaeróbios. Se esse for o caso, faz-se repicagem para três meios distintos: um meio de CDC com um disco de antibiótico netilmicina, um meio de SchaedlerKV, e um de NE. Os microrganismos anaeróbios são intrinsecamente resistentes ao antibiótico, logo se houver crescimento à volta dos disco significa que existem bactérias anaeróbias. Caso não existam, consegue-se observar um halo à volta do disco. Estes meios são incubados numa câmara de anaerobiose, durante 48h, e são posteriormente retirados para análise.

## Resultados

Neste estudo foram analisadas, no total, 70 amostras. Destas, 36 eram exsudatos de ferida cirúrgica, 19 exsudatos de ferida não cirúrgica, 12 pus de abscesso, 1 biopsia, 1 exsudato orofaríngeo e 1 endometrite, como está representado na Tabela 1 e Figura 11.

*Tabela 1 - Amostras recolhidas no presente estudo*

Tipo amostra	Nº amostras recolhidas
Exsudato ferida cirurgica	36
Exsudato ferida não cirurgica	19
Pus abscesso	12
Biopsia	1
Exsudado orofaríngeo	1
Endometrite	1
<b>Total</b>	<b>70</b>

### Tipo de amostras recolhidas

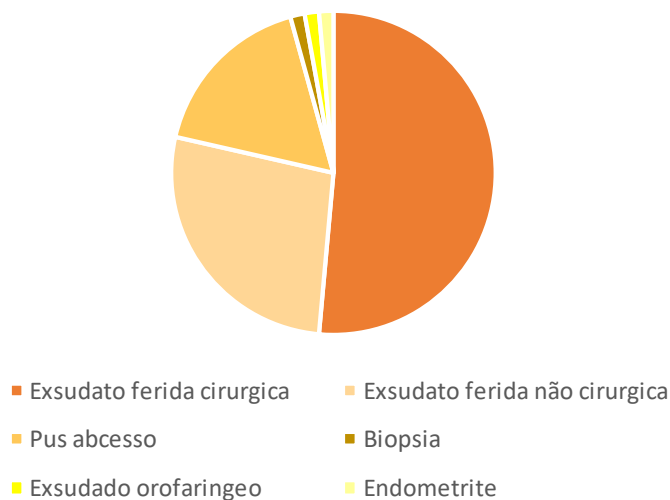


Figura 11 - Gráfico representativo do tipo de amostras recolhidas

Pela análise da Figura 12 e da Tabela 2 observa-se que das 70 amostras processadas, 11 tiveram resultados negativos, ou seja, não houve crescimento de microrganismos. 20 das amostras totais foram processadas sem a ajuda do meio *Cooked Meat*, o que indica que o crescimento observado nas placas primárias foi suficiente para o diagnóstico. No entanto, 39 amostras foram processadas com a ajuda do meio *Cooked Meat*. De alguma forma este meio foi importante para o diagnóstico e ajudou a recuperar microrganismos que não foram encontrados nos meios primários. Este valor corresponde a mais de 50% do total das amostras. Estes resultados revelaram a importância do meio *Cooked Meat* para o diagnóstico a partir de amostras em zaragatoa.

Tabela 2 - Amostras processadas com ou sem o auxílio do meio CM

	Amostras processadas sem CM	Amostras processadas com CM	Amostras negativas	Total
Nº amostras	20	39	11	70
Percentagem (%)	28,6	55,7	15,7	100

## Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

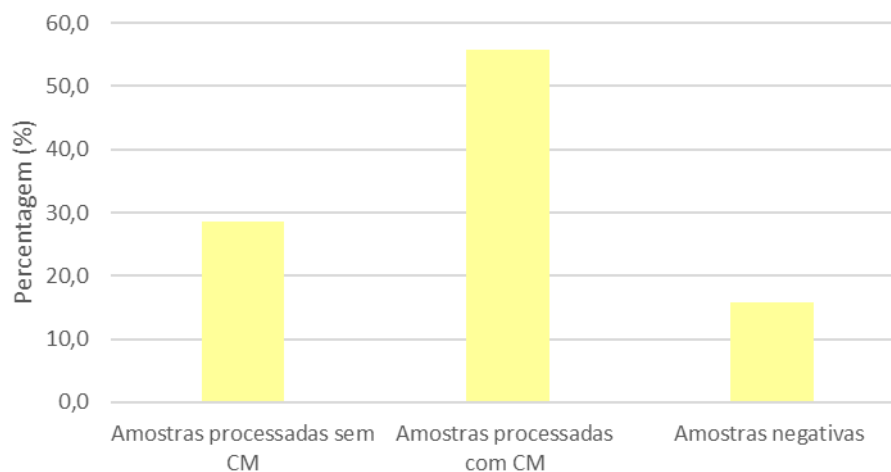


Figura 12 - Percentagem de amostras processadas com ou sem o auxílio do meio CM (Cooked Meat)

Desta forma, e perante os resultados obtidos, considero que o meio CM é uma mais-valia na recuperação de microrganismos em zaragatoa, uma vez que este demonstrou ser o mais eficaz para o efeito.

Com este projeto conseguiu-se provar a capacidade de recuperação de microrganismos em relação aos meios primogénitos. Muitas vezes, o uso de zaragatoas para colheita de amostra traz muitos microrganismos da flora natural da pele, o que pode comprometer a identificação de agentes patogénicos presentes na amostra. Com a ajuda do meio CM, consegue-se fazer crescer os patogénicos, facilitando a sua identificação. Também foi um grande auxílio na identificação de microrganismos anaeróbios, pois este meio permite observar facilmente a sua presença (através das bolhas de gás), o que não seria possível usando apenas meios agar.

Assim sendo, e respondendo à questão a que me propus, amostras em zaragatoa são suficientes para identificação de microrganismos desde que estas sejam inoculadas usando um meio de recuperação de microrganismos, como o *Cooked Meat*.



## Conclusão

Com a realização deste estágio curricular, efetuado no Serviço de Patologia Clínica do CHUC consegui aprofundar os meus conhecimentos na área de Microbiologia Clínica. Tive o privilégio de estagiar num laboratório de referência, a nível nacional, e não podia estar mais agradecida.

Foi uma experiência muito enriquecedora, que me permitiu explorar a minha paixão nesta área. Graças ao ótimo ambiente humano, nunca me senti excluída, o que me possibilitou adquirir conhecimentos e novas competências.

Ao ter passado pelas várias etapas de processamento de amostras apercebi-me de um grande problema que ainda hoje existe, a colheita incorreta das amostras. Assim, juntamente com a Dra. Catarina Chaves, desenvolvi um projeto que abordou essa problemática, de onde surgiram as amostras colhidas em zaragatoa. Perante isso, fui acompanhando todo o tipo de amostras que chegassem ao laboratório neste formato, focando mais a minha atenção nas amostras purulentas (abcessos, exsudatos de ferida).

Assim, consegui concluir que embora se recebam ainda muitas amostras em zaragatoa, estas conseguem ser bem aproveitadas quando se usa o meio CM para recuperação de microrganismos presentes na amostra. Sem o uso deste meio seria muito difícil conseguir identificar certos patogénicos presentes.

Junto ao clínico responsável por estas amostras, à Dra. Catarina e aos médicos internos que iam passando nessa área, aprofundei os meus conhecimentos sobre este tipo de amostras.

Foi uma experiência muito importante para mim, não só profissionalmente, mas também pessoalmente. Levo esta experiência comigo para o resto da vida!



## Referências Bibliográficas

- [1] M. A. Bachman and W. D. LeBar, “First Principles of Clinical Microbiology: Collection, Handling, and Diagnostics,” in *Encyclopedia of Microbiology*, 4th ed. Elsevier, 2019, pp. 276–281. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.66116-0.
- [2] D. D. Rhoads, V. Sintchenko, C. A. Rauch, and L. Pantanowitz, “Clinical microbiology informatics,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 27, no. 4, pp. 1025–1047, Oct. 2014, doi: 10.1128/CMR.00049-14.
- [3] Saurav Patra MD, Brijesh Mukherjee, and Ashok Kumar Das, “Pre-analytical errors in the clinical laboratory and how to minimize them,” *Int J Bioassays*, pp. 551–553, 2013, Accessed: Oct. 15, 2022. [Online]. Available: [www.ijbio.com](http://www.ijbio.com)
- [4] M. Lifshitz, “Optmizing laboratory workflow and performance,” in *Henry’s clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 23rd ed. Elsevier, 2017, pp. 13–21.
- [5] J. A. Hammerling, “A review of medical errors in laboratory diagnostics and where we are today,” *Lab Med*, vol. 43, no. 2, pp. 41–44, Feb. 2012, doi: 10.1309/LM6ER9WJR1IHQAUY.
- [6] R. B. Carey *et al.*, “Implementing a Quality Management System in the Medical Microbiology Laboratory,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 31, no. 3, Jul. 2018, doi: 10.1128/CMR.00062-17.
- [7] M. Plebani, “Diagnostic errors and laboratory medicine-causes and strategies,” *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, pp. 7–14, 2015.
- [8] S. Ambachew *et al.*, “Errors in the Total Testing Process in the Clinical Chemistry Laboratory at the University of Gondar Hospital, Northwest Ethiopia,” *Ethiop J Health Sci*, vol. 28, no. 2, pp. 235–244, Mar. 2018, doi: 10.4314/ejhs.v28i2.15.
- [9] M. S. Lifshitz, “Preanalysis,” in *Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, R. A. McPherson and M. R. Pincus, Eds., 24th ed. Elsevier, 2022, pp. 22–34.
- [10] R. Hawkins, “Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process,” *Ann Lab Med*, vol. 32, no. 1, pp. 5–16, Jan. 2012, doi: 10.3343/alm.2012.32.1.5.

- [11] K. Sikaris, “Performance criteria of the post-analytical phase,” in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Walter de Gruyter GmbH, May 2015, pp. 949–958. doi: 10.1515/cclm-2015-0016.
- [12] A. E. Zemlin, “Errors in the Extra-Analytical Phases of Clinical Chemistry Laboratory Testing,” *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 33, no. 2, pp. 154–162, Apr. 2018, doi: 10.1007/s12291-017-0657-2.
- [13] J. Yoshimura, H. Ogura, and J. Oda, “Can Gram staining be a guiding tool for optimizing initial antimicrobial agents in bacterial infections?” *Acute Medicine & Surgery*, vol. 10, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1002/ams2.862.
- [14] J. Tantray, S. Mansoor, R. Wani, and N. Nissa, “Gram staining of bacteria,” in *Basic Life Science Methods*, 2022, pp. 181–183. doi: 10.1016/C2021-0-02283-5.
- [15] G. J. Tortora, B. R. Funke, and C. L. Case, *Microbiology*, 10th ed. 2012.
- [16] A. R. Eberly, J. L. Elvert, and A. N. Schuetz, “Best Practices for the Analytic Phase of Anaerobic Bacteriology,” *Clin Microbiol Newsl*, vol. 44, pp. 91–97, 2022.
- [17] L. Samuel and M. Plebani, “Targeting errors in microbiology: The case of the Gram stain,” *Clin Chem Lab Med*, vol. 55, no. 3, pp. 309–310, Mar. 2017, doi: 10.1515/cclm-2016-0828.
- [18] J. C. Lagier, S. Edouard, I. Pagnier, O. Mediannikov, M. Drancourt, and D. Raoult, “Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 28, no. 1, pp. 208–236, Jan. 2015, doi: 10.1128/CMR.00110-14.
- [19] L. M. Prescott, J. P. Harley, and D. A. Klein, *Microbiology*, 5th ed. McGraw Hill, 2002.
- [20] P. Casino *et al.*, “Use of Blood Powder (Ground and Irradiated) for the Manufacture of Chocolate Agar,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 9, May 2023, doi: 10.3390/ijms24097965.
- [21] M. J. Zimbardo, D. A. Power, S. M. Miller, G. E. Wilson, and J. A. Johnson, “Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media,” 2009.
- [22] R. Buxton, “Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols,” *American Society for Microbiology*. 2016. [Online]. Available: [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org)
- [23] Becton Dickinson and Company, “BD CLED Agar,” 2012.

- [24] A. Wanger, V. Chavez, R. S. P. Huang, A. Wahed, J. K. Actor, and A. Dasgupta, “Media for the Clinical Microbiology Laboratory,” in *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*, Elsevier, 2017, pp. 51–60. doi: 10.1016/b978-0-12-805351-5.00004-1.
- [25] Bio-Rad, “Columbia CNA + 5% Sheep Blood,” 2015. [Online]. Available: <http://www.bio-rad.com/certificate>
- [26] P. M. Tille, *Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology*, 14th ed. Elsevier, 2018. doi: 10.1016/B978-0-323-35482-0.00001-5.
- [27] P. Morency-Potvin, D. N. Schwartz, and R. A. Weinstein, “Antimicrobial stewardship: How the microbiology laboratory can right the ship,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 30, no. 1, pp. 381–407, 2017, doi: 10.1128/CMR.00066-16.
- [28] S. Tsuchida, H. Umemura, and T. Nakayama, “Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology,” *Molecules*, vol. 25, no. 20, Oct. 2020, doi: 10.3390/molecules25204775.
- [29] T. Y. Hou, C. Chiang-Ni, and S. H. Teng, “Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology,” *J Food Drug Anal*, vol. 27, no. 2, pp. 404–414, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.jfda.2019.01.001.
- [30] Bruker, “MALDI-TOF/TOF.” [https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html?page\\_1=1](https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html?page_1=1) (accessed Sep. 01, 2023).
- [31] B. W. Buchan and N. A. Ledebor, “Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 27, no. 4, pp. 783–822, Oct. 2014, doi: 10.1128/CMR.00003-14.
- [32] P. Morency-Potvin, D. N. Schwartz, and R. A. Weinstein, “Antimicrobial stewardship: How the microbiology laboratory can right the ship,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 30, no. 1, pp. 381–407, Jan. 2017, doi: 10.1128/CMR.00066-16.
- [33] R. Leclercq *et al.*, “EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 19, no. 2, pp. 141–160, 2013, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
- [34] I. Gajic *et al.*, “Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11040427.

- [35] C. G. Giske, J. Turnidge, R. Cantón, and G. Kahlmeter, “Update from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST),” *J Clin Microbiol*, vol. 60, no. 3, 2022, [Online]. Available: <https://mic.eucast.org/>.
- [36] M. Benkova, O. Soukup, and J. Marek, “Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice,” *J Appl Microbiol*, vol. 129, no. 4, pp. 806–822, Oct. 2020, doi: 10.1111/jam.14704.
- [37] J. H. Jorgensen and M. J. Ferraro, “Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 11, pp. 1749–1755, Dec. 2009, doi: 10.1086/647952.
- [38] M. A. Pence and R. Liesman, “Clinical microbiology,” in *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, Elsevier, 2020, pp. 985–1006. doi: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00055-7.
- [39] A. R. Eberly, J. L. Elvert, and A. N. Schuetz, “Best Practices for the Pre-Analytic Phase of Anaerobic Bacteriology,” *Clin Microbiol Newsl*, vol. 44, pp. 63–71, Apr. 2022.
- [40] Prof. Doutor J. Melo Cristino, “Manual de Colheitas: Serviço de Patologia Clínica,” 2017.



## Apêndice

I - Tabela de recolha de dados das amostras processadas assim como os microrganismos identificados; Legenda: C – houve crescimento, NC – não houve crescimento, PM – pobre e polimicrobiano, P – purulento, L – límpido, m.o. – microrganismos

Nº amostra	Meio Primogénito	Meio CM	m.o. identificados a partir do Meio Primogénito	m.o. identificados a partir do Meio CM	Anaeróbios Meio CM	Tipo amostra
1	C	P	<i>Providencia rettgeri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Providencia rettgeri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Exsudato ferida não cirúrgica
2	C	P	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterococos faecalis</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
3	C	P	<i>Enterococos avium</i>	<i>Enterococos avium</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Peptoniphilus harei</i> <i>Prevotella melaninogenica</i>	Exsudato ferida cirúrgica
4	NC	L				Exsudato ferida não cirúrgica
5	C	P	<i>Actinomyces turcensis</i>		<i>Prevotella bivia</i> <i>Peptoniphilus indolicus</i>	Exsudato ferida cirúrgica
6	C	P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Fusobacterium gonidiaformans</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Exsudato ferida cirúrgica
7	C	P	<i>Enterococos faecalis</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Providencia vermicola</i>	<i>Prevotella brevis</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
8	C	P	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Veillonella parvula</i>	Exsudato ferida cirúrgica
9	C	P	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Exsudato ferida não cirúrgica

Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

10	C	P	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus avium</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus avium</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	Exsudato ferida cirúrgica
11	C	P	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>		Exsudato ferida não cirúrgica
12	C	P	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>		Biopsia
13	C	P	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		Exsudato ferida cirúrgica
14	PM	P		<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Prevotella buccae</i> <i>Prevotella intermedia</i>	NC	Exsudato orofaríngeo
15	C	P	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>		Exsudato ferida cirúrgica
16	C	P	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>		Exsudato ferida cirúrgica
17	C	P	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		Pus de abcesso
18	NC	P			<i>Finegoldia magna</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
19	NC	L				Exsudato ferida cirúrgica
20	PM	P		<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>		Exsudato ferida cirúrgica
21	C	P	<i>Streptococcus intermedius</i>		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
22	PM	P		<i>Staphylococcus aureus</i>		Exsudato ferida cirúrgica

Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

23	NC	P			<i>Cutibacterium acnes</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
24	NC	P		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Finegoldia magna</i> <i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	Pus de abscesso
25	NC	L				Pus de abscesso
26	C	P	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	NC	Pus de abscesso
27	PM	P		<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
28	C	P	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
29	NC	P		<i>Serratia marcescens</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
30	C	P	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	NC	Exsudato ferida não cirúrgica
31	C	P	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>		Exsudato ferida cirúrgica
32	NC	P			<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Parvimonas micra</i>	Exsudato ferida cirúrgica
33	C	P	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NC	Pus de abscesso
34	C	P	<i>Streptococcus intermedius</i>		<i>Veillonella atypica</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Exsudato ferida cirúrgica
35	C	P	<i>Morganella morganii ssp sibirica</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
36	NC	P			<i>Prevotella bivia</i> <i>Parvimonas micra</i>	Exsudato ferida cirúrgica

Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

37	C	P	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus</i>		Pus de abcesso
38	NC	P			<i>Finogoldia magna</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
39	C	P	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i> <i>Proteus mirabilis</i>	NC	Pus de abcesso
40	PM	P		<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Morganella morganii ssp morganii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
41	NC	L				Exsudato ferida não cirúrgica
42	C	P	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	NC	Exsudato ferida não cirúrgica
43	C	P	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
44	NC	L				Pus de abcesso
45	C	P	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
46	C	P	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		Exsudato ferida cirúrgica
47	C	P	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
48	NC	P		<i>Cutibacterium acnes</i>		Exsudato ferida cirúrgica
49	NC	L				Exsudato ferida cirúrgica
50	C	P	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica
51	NC	L				Exsudato ferida cirúrgica
52	NC	L				Exsudato ferida cirúrgica

Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

53	NC	L			NC	Pus de abscesso
54	NC	L			NC	Pus de abscesso
55	NC	L			NC	Exsudato ferida cirúrgica
56	NC	P		<i>Escherichia coli</i>		Exsudato ferida não cirúrgica
57	C	P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		Exsudato ferida cirúrgica
58	C	P	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	NC	Pus de abscesso
59	C	P	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Morganella morganii</i>	<i>Prevotella bivia</i>	Exsudato ferida cirúrgica
60	C	P	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		Exsudato ferida não cirúrgica
61	C	P	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	NC	Pus de abscesso
62	C	P	<i>Streptococcus constellatus</i>		NC	Exsudato ferida cirúrgica
63	C	P	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>		Exsudato ferida cirúrgica
64	NC	P		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Veillonella dispar</i>	Endometrite
65	C	P	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		Exsudato ferida não cirúrgica
66	C	P	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Escherichia coli</i>		Exsudato ferida cirúrgica
67	C	P	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Prevotella disiens</i> <i>Clostridium innocuum</i>	Exsudato ferida não cirúrgica
68	C	P	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		Exsudato ferida não cirúrgica
69	NC	P		<i>Acinetobacter ursigii</i> <i>Streptococcus constellatus</i>	NC	Exsudato ferida cirúrgica

Relatório Estágio & Colheita Amostras em Zaragatoa

70	NC	P	<i>Finegoldia magna</i> <i>Prevotella buccalis</i>	Exsudato ferida cirúrgica
----	----	---	---	---------------------------

---