

B10-18

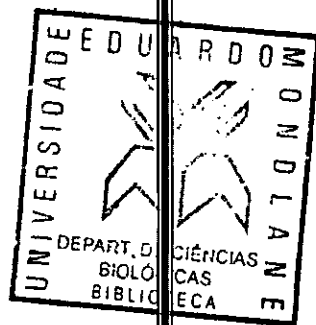


UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas



### Relatório de Culminação de Curso

**Técnicas de Diagnóstico de Enterobactérias Patogénicas Isoladas em Material Biológico no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo**

**Autora:** Ilda Paulino Langa

Repetido  
②

Maputo, Outubro de 2007



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Ciências Biológicas**

**Relatório de Culminação de Curso**

**Técnicas de Diagnóstico de Enterobactérias Patogénicas Isoladas em Material Biológico no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo**

**Autora: Ilda Paulino Langa**



Maputo, Outubro de 2007



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Ciências Biológicas**

**Relatório de Culminação de Curso**

**Técnicas de Diagnóstico de Enterobactérias Patogénicas Isoladas em Material Biológico no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo**

**Autora:** Ilda Paulino Langa

**Supervisoras:** Dr<sup>a</sup>. Cristina Beatriz

Dr<sup>a</sup>. Teresa Infanti

Maputo, Outubro de 2007

## Agradecimentos

Expresso a minha gratidão em primeiro lugar a Deus e a Jesus Cristo, porque sem eles, este momento já mais chegaria na minha vida.

As minhas supervisoras Dr.<sup>a</sup> Cristina Beatriz e Dr.<sup>a</sup> Teresa Infanti, vai o meu muito obrigado, pela compressão, paciência e atenção que tiveram comigo.

A toda minha família, que de alguma maneira contribuíram e incentivaram a realização deste trabalho.

A Dr.<sup>a</sup> Elisabeth, por ter autorizado o meu estágio no Laboratório de Análises Clínicas do HCM.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo, Alexandre, David, Raul, dr.<sup>o</sup> Rafael, pela orientação, estando sempre disponíveis e atenciosos para esclarecimentos.

A dr.<sup>a</sup> Cidália e a dr.<sup>a</sup> Camélia por todo apoio e colaboração, onde sempre estiveram à disposição colaborando e discutindo assuntos relacionados ao trabalho desenvolvido e ainda pelo carinho, amor e atenção.

Ao dr.<sup>o</sup> Leonel, dr.<sup>a</sup> Assa, dr.<sup>a</sup> Ivete e dr.<sup>a</sup> Thebora, pelas sugestões e pela disposição em compartilhar informações e o seus conhecimentos.

Aos os meus colegas de curso Nelson, Hélder e Crimildo, pelas sugestões e troca de informações:

A todos que directa ou indirectamente contribuíram para elaboração deste trabalho, vai também o meu agradecimento muito especial.

**Declaração de honra**

Eu, Ilda Paulino Langa, declaro por minha honra que os dados aqui apresentados são verdadeiros.

---

Ilda Paulino Langa

### **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais Paulino Paulo Langa que infelizmente não está mais entre nós e Ana Vicente Manguê, por todo o incentivo, carinho, amor, onde estiveram sempre presentes motivando-me nos momentos mais difíceis, a eles serei eternamente grata.

Ao meu amado esposo Fernando Joaquim Nhassengo, a minha Filhinha Ariane Nhassengo, que sempre estiveram presentes com muita paciência e muito amor, incentivando e colaborando para a realização deste trabalho.

Sem me esquecer dos meus irmãos e sobrinhos, João Paulo, Eulália, Paula, Paulo, Isabel, Carolina, Sebastião, Francisco, Vicente, Patrícia e Elídio, pelo apoio incansável, concedido durante a realização deste trabalho. A minha dedicação estende-se também para a minha sogra Laurinda.

### **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Morfologia cultural das colónias de Enterobacteriaceae nos diferentes meios de Cultura.

**Tabela 2.** Frequências absolutas e relativas dos casos positivos das amostras biológicas com o respectivo número de bactérias encontradas.

**Tabela 3.** Valor absoluto e relativo das diferentes bactérias encontradas no sexo Masculino.

**Tabela 4.** Valor absoluto e relativo das diferentes bactérias encontradas no sexo Femenino

**Tabela 5.** Frequência de bactérias encontradas nas diferentes faixas etárias do sexo masculino.

**Tabela 6.** Frequência de bactérias encontradas nas diferentes faixas etárias do sexo feminino.

**Tabela 7.** Relação entre as bactérias e a proveniência.

**Tabela 8.** Percentagem sensibilidade aos principais antimicrobianos testados para as bactérias isoladas nas amostras de urina.

**Lista de figuras .**

**Figura 1.** Frequência das bactérias isoladas nas amostra de urina



## Lista de abreviaturas

ÁC. Nald. – Ácido Nalidixico

Amp. – Ampicilina

API – Analyse Profile Index

*C. freundii* – *Citrobacter freundii*

Ciprof. – Ciprofloxacina

CLED – Cistina Lactose Electrolits Deficient

DNA – Ácido disoxoribonucleico

DNS – Direcção Nacional de Saúde

*E. coli* – *Escherichia coli*

Gent. – Gentamicina

HCM – Hospital Central de Maputo

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

LAC— Laboratório de análises clínicas

LCR – Líquido Céfalo-Raquidiano

NHLS – National Helth Laboratory Service

Nitrof. — Nitrofurantoina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PH – Potencial hidrogeniônico

SS – *Salmonella e Shigella*

Sulf. — Sulfametazol

TSA – Teste de sensibilidade antibioticos

## Resumo

O presente relatório de estágio, foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo, Sector de Microbiologia, Secção de Bacteriologia no período de Maio a Agosto de 2007, teve como objectivo principal identificar as espécies de Enterobactérias patogénicas mais frequentes nas amostras de urina relacionado-as com a idade, sexo e proveniência da amostra, tendo-se feito também o teste de sensibilidade aos antibióticos, para as bactérias identificadas.

Nas amostras de urina verificou-se com maior frequência a *E. coli* com 69% seguindo-se a *K. pneumoniae* com 24%, *Proteus sp* com 4% e por último *Enterobacter spp*, *C. freundii*, ambas com 2%.

As espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* foram mais frequentes no sexo masculino na faixa etária entre os seus 0-8 anos de idade. Quanto a proveniência das amostras constatou-se que houve maior frequência de ambas as bactérias nas amostras vindas das enfermarias, com uma percentagem de 86.8% para *E. coli* e 53.8% para *K. pneumoniae*.

No teste de sensibilidade aos antibióticos as bactérias *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus spp* apresentaram sensibilidade as drogas nitrofurantoina, ciprofloxacina, ácido nalidixico e gentamicina. A espécie de *Enterobacter spp* mostrou sensibilidade somente para ciprofloxacina e gentamicina, enquanto que *Citrobacter freundii* apresentou sensibilidade apenas para nitrofurantoina. A resistência bacteriana aos antimicrobianos ampicilina e Sulfametoxazol foi observada para todas as bactérias.

Análises adicionais para possíveis discussões foram feitas em amostras de fezes, expectoração, líquido céfalo-raquidiano e sangue.

Nas amostras de expectoração a *K. Pneumoniae* foi a única enterobactéria encontrada. No líquido-cefalo-raquidiano e nas fezes a *E. coli* foi a bactéria encontrada com maior frequência. Nas amostras de sangue verificou-se com maior frequência a bactéria *Salmonella spp* e *K. Pneumoniae*.

## 1. Apresentação e caracterização da Unidade do Estágio

O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas, Sector de Microbiologia, Secção de Bacteriologia, do Hospital Central de Maputo, situado entre as avenidas Eduardo Mondlane, Salvador Allende, Thomas Nduda e Agostinho Neto. Este é até hoje a maior Unidade Hospitalar em Moçambique e possui diversos serviços, tais como: Serviços de Urgência, Maternidade, Estomatologia, Dermatologia, Oftamologia, Ortopédia, Cirurgia, Pediatria, Urologia, dentre outros.

O Laboratório de Análises Clínicas possui três Sectores, nomeadamente: Sector de Hematologia, Bioquímica e Microbiologia e ainda uma sala de colheitas das amostras. O sector de Microbiologia subdivide-se em três Secções: Serologia, Bacteriologia e Parasitologia.

A Secção de Serologia realiza testes para HIV, sífilis, espermograma e testes em lactex de toxoplasmose, realiza ainda exames citoquímicos de líquidos orgânicos.

A Secção de Parasitologia desenvolve análises através de amostras de fezes e de urina. Nas amostras de fezes são feitos testes para a pesquisa de amido, gorduras e quistos de diversos parasitas. Enquanto que nas amostras de urinas são feitos testes para a detenção de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais, cilindros que são indicativos de infecção urinária.

Na Secção de Bacteriologia é feita a identificação e o isolamento de bactérias responsáveis pela infecção bem como testes de sensibilidade aos antibióticos, com a finalidade de indicar a terapêutica antimicrobiana eficaz para os agentes responsáveis pela a infecção.

O estagiário teve como supervisora do estágio a Dr<sup>a</sup> Teresa Infante, Médica e especialista em Microbiologia.

### 1.1 Breve Historial do Laboratório de Análises Clínicas do HCM

O LAC do HCM foi o primeiro laboratório criado em Moçambique, no ano de 1908 tendo-lhe sido atribuído um carácter oficial em 1914. Este laboratório encontrava-se instalado num dos torrões da rua das Mahoatas e tinha a designação de Gabinete Bacteriológico e Parasitológico. No entanto, reconhecendo-se o acanhamento das suas instalações, passou a funcionar na 2ª enfermaria e mais tarde no Hospital Central Miguel Bombarda (actualmente chamado HCM) (Anónimo, 1956).

Dois factos dignos de registo, e que até certo ponto documentam o desenvolvimento dos serviços em Moçambique na defesa contra os agentes patogénicos, são os esforços despendidos pelo referido laboratório de Bacteriologia, a quando da epidemia da gripe pneumónica que ocorreu nos anos de 1918-1919, no estabelecimento do parque vicinogénico. Os aturados trabalhos efectuados no laboratório levaram à produção da vacina antigripal e antipneumocócica, que teve largo uso em toda a Província de Maputo, com os mais lisonjeiros resultados (Anónimo, 1956).

Segundo Langa (2006), pelo Decreto nº 34:417 de 1945, os serviços laboratoriais do Hospital Central Miguel Bombarda passaram a subdividir-se em: Laboratório de análises Químicas, Bramatológicos e Toxicológicos, Laboratório de Análises Clínicas e Bacteriológicos, Transfusões de Sangue e Anatomia Patológica.

Os serviços do Laboratório Miguel Bombarda, contribuíram em larga escala para melhoria dos serviços de saúde na campanha contra a lepra e tuberculose em 1954, na identificação de doenças venéreas, raiva, varíola, tripanossomia, doenças sazonais, bilharziose, boudas, úlceras fagedénicas e vermes intestinais de variadas espécies (Langa, 2006).

Depois da Independência, em 1975, os serviços do laboratório passaram várias dificuldades, desde a falta de pessoal especializado, material, e manutenção de equipamento laboratorial e falta de orçamento para investigação científica. Nos fins dos anos 80, os serviços do laboratório do actual HCM, retomaram a actividade de investigação, sendo actualmente um dos melhores laboratórios de referência nacional,

isto deve-se à existência de melhores condições de trabalho, material e equipamento actualizado, com técnicos especializados e bem treinados (Langa, 2006).

## 2. Programa do estágio

O estágio consistiu de duas fases, a fase de familiarização com o local do estágio que decorreu do mês de Janeiro ao mês de Fevereiro, seguindo-se a fase de estágio, que decorreu de Maio á Agosto de 2007.

### 2.1 Objectivos

#### Generais

- ✓ Conhecer, compreender e saber executar todas as técnicas de diagnóstico bacteriológico usadas no Laboratório de Análises Clínicas do HCM.
- ✓ Conhecer e saber executar todas as técnicas de diagnóstico de Enterobactérias, usadas no LAC do HCM.

#### Específicos

- ✓ Adquirir e desenvolver habilidades técnicas e profissionais;
- ✓ Saber interpretar os resultados das análises microbiológicas efectuadas;
- ✓ Identificar as espécies de enterobactérias patogénicas mais frequentes em amostras de urina, relacionando-as com o sexo, idade e proveniência da amostra;
- ✓ Avaliar o padrão de sensibilidade aos antibióticos (TSA), das espécies de enterobactérias patogénicas identificadas nas amostras de urina.

qual foi a sua  
principal conclusão  
após

### 3. Apoio concedido pela unidade de estágio

O estagiário recebeu de todos os técnicos do laboratório, o apoio necessário desde a assistência técnica científica, moral, material bibliográfico e informático.

### 4. Revisão bibliográfica

A Microbiologia é o ramo da biologia que estuda os microorganismos, incluindo eucariontes unicelulares e procariontes, como as bactérias, fungos e vírus. Muitos microorganismos vivem livremente e desempenham uma actividade útil e benéfica para a vida das plantas e animais (Cheesbrough, 1984).

Segundo Sartori (2005), as bactérias são células procarióticas uni ou pluricelular, com organização celular relativamente simples. Apresentam tamanho que varia em média de 1 a 2  $\mu\text{m}$  por 1 a 4  $\mu\text{m}$ . A membrana nuclear está ausente e o ácido desoxiribonucléico (DNA) é uma macromolécula de dupla fita circular, com um comprimento de aproximadamente 1.100 nm, altamente empacotada.

Embora a parede celular que circunda as bactérias seja complexa, elas apresentam-se somente em duas formas: as bactérias Gram-positivas que têm uma parede celular com a camada de peptidoglicano grossa, composta por ácidos teicóicos e teicurónicos, que são os seus determinantes antigénicos de superfície, e as bactérias Gram-negativas que apresentam a parede celular com a camada de peptidoglicano fina composta por lipopolissacarídeos e polissacarídeos como principais determinantes antigénicos de superfície (Folgosa e Martelli, 1985, Murray *et al.*, 1998).

As bactérias são capazes de atravessar as defesas normais do corpo humano e causar doenças, através da invasão de tecidos por crescimento ou produção de toxias. Tal invasão é denominada de infecção, e as bactérias capazes de a causar são chamadas de patogénicas. O desenvolvimento de uma infecção depende das complexas interações de susceptibilidade do hospedeiro á infecção, do potencial de virulência da bactéria e da oportunidade de interação entre o hospedeiro e a bactéria (Murray *et al.*, 1998).

As bactérias podem ser classificadas com base na sua morfologia (cocos, bacilos, curvos ou espiralados, espiroquetas), na coloração de Gram que é o método mais usado em bacteriologia para o seu diagnóstico e identificação, podendo diferenciá-las em Gram positivas e Gram negativas, coloração de Ziehl-Neelsen, usada para diferenciar os bacilos álcool-ácido-resistente, nas necessidades do oxigénio para o crescimento, nas características bioquímicas e na aparência macroscópica das colónias (p.ex: propriedades hemolíticas em agar-sangue, cor das colónias, tamanho e forma das colónias) (Cheesbrough, 1984, Murray *et al.*, 1998).

Várias espécies de bactérias são capazes de variar a sua forma que é determinada pelo comprimento das cadeias de peptidoglicano e especialmente pela quantidade de interligações existentes entre estas cadeias, especialmente quando em crescimento num meio de cultura artificial, sendo chamadas de polimórficas (Cheesbrough, 1984).

A caracterização bioquímica é o método mais frequentemente usado para a identificação definitiva das bactérias. Ela avalia a actividade metabólica das bactérias em relação a certos compostos orgânicos, tais como açúcares e compostos azotados. Esta caracterização pode ainda ser usada para identificar os organismos até as espécies, principalmente com o objectivo epidemiológico (Folgosa e Martelli, 1985, Murray *et al.*, 1998).

Segundo Koneman *et al.*, (2001), em cada procedimento bioquímico, a bactéria desconhecida causará uma alteração do meio ao qual foi adicionada uma substância específica de teste.

A modificação poderia ser indicada pela formação de um gás ou fermentação de carboidratos. Uma alteração na coloração pode ocorrer no meio como resultado de um indicador de pH, que pode resultar de um ácido que é produzido durante a reacção de fermentação. Algumas reacções, como a produção de indol a partir do triptofano, são comumente utilizados no sistema de identificação rápida (Jawetz *et al.*, 1991, Koneman *et al.*, 2001).

Os testes serológicos são usados para determinar os grupos serológicos dos organismos e consistem em avaliar as reacções de aglutinação com anti-soros específicos e identificar agentes que são dificilmente isolados em laboratório ou que produzem doenças com evolução lenta assim como determina os tipos de anticorpos em pacientes

com doenças desconhecidas (Folgosa e Martelli, 1985, Jawetz *et al.*, 1991 Murray *et al.*, 1998).

Assim que o microrganismo causador da doença estiver identificado, determina-se a sua sensibilidade aos antibióticos. Este teste consiste na exposição do microrganismo à acção de vários antibióticos de baixa concentração, com a capacidade de matar ou inibir o crescimento dos mesmos, ajudando deste modo, na escolha do antibiótico mais eficaz para o tratamento da doença (Walters *et al.*, 1997, Murray *et al.*, 1998).

O teste de sensibilidade aos antibióticos deve realizar-se para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a susceptibilidade não puder ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo. Os testes de susceptibilidade estão principalmente indicados quando o microrganismo pertence a uma espécie capaz de produzir doenças, quando é provável que o processo infeccioso seja fatal se não for tratado especificamente, quando o microrganismo não é eliminado pelos agentes antimicrobianos já utilizados no processo terapêutico (Jawetz *et al.*, 1991, Fonseca, *et al.*, 2004).

Segundo Sartori, (2005) os agentes antimicrobianos podem exercer sua influência sobre a parede celular e/ou membrana celular, sobre a actividade enzimática, bloqueando certas reacções enzimáticas ou síntese de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desse microrganismo.

Segundo Nester *et al.*, (1998), a mutação e a transferência da informação genética permitem aos microorganismos desenvolver com alguma facilidade resistência às drogas antimicrobianas.

#### **4.1 Família Enterobacteriaceae**

Os seres humanos, e os animais, apresentam uma abundante flora normal que consiste numa população de microorganismos que vivem em determinados locais do corpo humano,



sem causar doenças; alguns estabelecem-se de uma forma permanente num determinado local do nosso corpo, outros o fazem-no por períodos limitados de tempo. A maioria das bactérias não provocam doenças, atingindo um equilíbrio com o hospedeiro que garante a sobrevivência, o crescimento e a propagação, não só da bactéria, assim como do hospedeiro (Jawetz *et al.*, 1991).

Os membros da família Enterobacteriaceae constituem um grande e heterogêneo grupo de bastonetes Gram-negativos, não espuralados e que podem medir cerca de 1-4 x 0,6 µm, cujo o habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e animais (Cheesbrough, 1984, Jawetz *et al.*, 1991, Marshall, 1995).

São aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, fermentam um grande número de carboidratos, possuem estrutura antigénica complexa e produzem uma variedade de toxinas e outros factores de virulência (Jawetz *et al.*, 1991, Koneman *et al.*, 2001).

Caracterizam-se, do ponto de vista bioquímico, pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos, fermentarem a glicose com a produção de ácido e gás e citocromo oxidase negativas. São as bactérias isoladas com mais frequência nas amostras biológicas (Jawetz *et al.*, 1991, Koneman *et al.*, 2001).

Esta família inclui alguns gêneros e espécies que podem estar associadas as infecções humanas (por ex., *Escherichia coli*; *Shigella* spp; *Salmonella* spp). Estas bactérias causam uma variedade de doenças humanas, incluindo 30% a 35% das septicémias, mais de 70% das infecções das vias urinárias e muitas infecções intestinais. Algumas espécies (p.ex.: *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Yersinia pestis*) estão sempre associadas a doenças humanas, ao passo que outras (p.ex.: *E. coli*, *K. Pneumoneae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia* spp) são membros comensais da flora normal intestinal que podem causar infecções oportunistas (Murray *et al.*, 1998, Fonseca, *et al.*, 2004).

## 5. Actividades desenvolvidas

Várias foram as actividades desenvolvidas no laboratório durante o período de estágio, a colheita de amostras biológicas até processamento das mesmas. A realização dos testes

de sensibilidade ao antibióticos, foram também actividades desenvolvidas, durante o período de estágio e constituem actividades fundamentais do laboratório.

## 5.1 Material

### a) Equipamentos

- ✓ Estufas
- ✓ Autoclave
- ✓ Centrifugas
- ✓ Homogenizador
- ✓ Balança analítica
- ✓ Geleiras
- ✓ Microscópico óptico

### b) Material Acessório

- ✓ Ansa
- ✓ Álcool
- ✓ Balões
- ✓ Bico de busen
- ✓ Pinças
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Pipetas plasticas e de vidro
- ✓ Zaragatoas
- ✓ Compressas
- ✓ Frascos
- ✓ Lâminas
- ✓ Luvas
- ✓ Palitos de fosforo

- ✓ Jarras
- ✓ Velas
- ✓ Suportes para tubos
- ✓ Seringas

### c) Reagentes

- ✓ Discos de antibióticos (p.ex.: ampicilina, gentamicina)
- ✓ Galeria API
- ✓ Agar
- ✓ Peróxido de hidrogénio
- ✓ Soro fisiológico
- ✓ Fitas de oxidase
- ✓ Plasma
- ✓ Parafina
- ✓ Reactivo de Kovac

### d) Meios de Cultura

- ✓ Agar MacConkey
- ✓ Agar Sangue
- ✓ Agar CLED
- ✓ Agar Mueller-Hinton
- ✓ SS (*Salmonella* e *Shigella* agar)
- ✓ Agar Selenite

## 5.2 Metodologia

O estudo microbiológico das enterobactérias patogénicas presentes nas diferentes amostras, provavelmente responsáveis pelo quadro clínico foi feito através do exame

microscópico e macroscópico, assim como a partir da sua sementeira em meios de cultura adequados para o seu crescimento e isolamento.

Como o isolamento do agente é muito importante na formulação de um diagnóstico, a amostra precisa ser colhida do local que mais provavelmente abriga o agente, em um determinado estágio da doença, e deve ser manipulada de modo a favorecer a sobrevivência e o crescimento do agente (Jawetz *et al.*, 1991).

As amostras biológicas para o diagnóstico das enterobactérias patogénicas eram provenientes das diferentes enfermarias e das consultas externas no período de Maio a Agosto.

### **5.2.1 Procedimentos para a Colheita e Transporte das Amostras Biológicas**

Todas as amostras biológicas devem ser colhidas e transportadas com o máximo de segurança e assépsia para evitar o mínimo de contaminação das mesmas afim de permitir um bom diagnóstico.

Quando a amostra não pode ser semeada logo após a colheita, pode-se usar meios de transportes semi-sólidos, que contêm nutrientes que previnem o crescimento de comensais e garantem a sobrevivência de patogénos aeróbicos e anaeróbicos (Cheesbrough, 1984).

#### **5.2.1.1 Normas gerais de colheita**

De acordo com Fonseca (2004), as normas gerais de colheita de amostras são:

1. Efectuar as colheitas, antes de iniciar a terapêutica antibiótica;
2. Evitar a contaminação da amostra com a flora saprófita do doente e/ou bactérias do ambiente, de modo a que a amostra seja representativa do local da infecção;
3. Utilizar material de colheita e de transporte apropriados e esterilizados;

4. Identificar claramente os recipientes, e não o invólucro de papel ou plástico, com o nome do doente, serviço, n.º de processo, data e hora da colheita e origem do produto biológico;
5. Colher o produto em quantidade suficiente para o(s) exame(s) requisitado(s). Os recipientes para a recolha de produtos líquidos não devem encher-se para além dos seus dois terços de capacidade;
6. Devem ser usados recipientes esterilizados de encerramento hermético e que não permitam, ao abrir, a formação de aerossóis.

#### **5.2.1.2 Normas Gerais de Transporte**

1. Transportar rapidamente todos os produtos biológicos para o laboratório;
2. Quando não é possível a entrega imediata da amostra ao laboratório, deve-se usar meios de transporte (como p.ex.: Stuart, muito usado para o transporte de amostras conjuntivais e genitais, meio de Cary Blair usado para o transporte de amostras de fezes e o soro fisiológico, usado para amostras de corrimento vaginal, quando o seu transporte para o laboratório for rápido) para garantir que amostra seja fiável.

#### **a) Urina**

##### **Colheita**

segundo Fonseca *et al.*, (2004) a urina é habitualmente um líquido biológico estéril, mas a sua passagem pela uretra durante a micção arrasta os microorganismos que a colonizam, podendo induzir a erros na interpretação da urocultura.

1. Colher a primeira urina da manhã, casos não seja impossível, colher a urina após ter estado pelo menos duas horas sem urinar;
2. Afastar os grandes lábios (mulheres) ou prepúcio (homens);
3. Lavagem prévia das mão e da região urogenital com gaze embebiada em água e sabão (a limpeza com água e sabão, não é usualmente necessária para homens), em geral, basta uma limpeza simples do meato urinário imediatamente antes da micção (Koneman *at al.*, 2001);
4. Usando o mesmo processo, lavar só com água esterilizada e secar com gaze de frente para trás, no caso das mulheres;
5. Desprezar o primeiro jacto de urina e, sem interromper a micção, (matendo o prepúcio retraído nos homens e os pequenos lábios afastados na mulher), recolher o jacto intermédio directamente para o recipiente esterilizado de boca larga, fechando-o imediatamente após a colheita.
6. Evitar tocar o recipiente na região dos órgãos genitais.

### **Transporte**

- Após a colheita, transportar a urina para o laboratório o mais rapidamente possível, uma vez que deve-se cultivar antes de decorridas uma hora após a colheita, caso não seja possível o seu transporte imediato, conservar a urina à temperatura de 4°C.

## **b) Fezes**

### **Colheita**

1. Entregar ao doente um frasco limpo e previamente esterelizado;
2. O doente deve dirigir-se à casa de banho, ou a outro lugar apropriado, para defecar directamente no frasco, ou primeiro num papel limpo, e depois transferir, com ajuda de um despendor limpo e seco, para o frasco;
3. Informar ao doente que a amostra não deve ser contaminada com urina e nem papel higiénico;
4. Informar ao doente que o frasco deve ser fechado com a tampa, para não permitir que a amostra entre em contacto com o ar e por fim que lava-se as mãos com água e sabão.

## **c) LCR**

### **Colheita**

1. Pedir ao doente para se sentar, ou deitar-se, numa cama, em posição de decúbito lateral, abraçando os joelhos e proporcionar iluminação adequada no local da punção;
2. Desinfectar a área da punção, usando compressas de gaze embebidas com a solução de povidine iodado, executando um movimento circular que se afasta do local da punção;
3. Deixar secar a pele;

4. Repetir a desinfeção com algodão embebido em álcool;
5. colocar o trocar entre as vértebras L3-L4, lembrando o doente que deve permanecer imóvel e respirando normalmente;
6. Colher em tubos estéreis e transparentes o volume mínimo de 1 ml, controlando a saída do líquido, para evitar descompensação (Segala, 1998).

### **Transporte**

- Enviar a amostra para o laboratório imediatamente após a colheita (uma vez que deve ser processada num máximo de 30 minutos após a sua colheita) ou manter à temperatura ambiente ou na estufa a 37° C. Nunca deve ser refrigerada.

### **d) Expectoração**

#### **Colheita**

1. Informar ao doente que deve colher a primeira expectoração da manhã, de preferência em jejum;
2. Lavar a boca e a garganta só com água estéril, ou fervida, antes da colheita;
3. Instruir ao doente para colher a expectoração por tosse profunda (evitando amostras de saliva ou secreções nasais posteriores).
4. Quando a tosse não é produtiva, pode estimular a formação da expectoração, usando um irritante como a solução salina hipertónica.



### **Transporte**

- Enviar rapidamente a amostra para o laboratório, à temperatura ambiente protegendo-a da luz, se o tempo de transporte for superior a 1-2 horas, a amostra pode ser refrigerada a 4° C.

### **e) Sangue**

#### **Colheita**

1. Informou-se ao doente que efectuaria-se a colheita do sangue por punção venosa de qualquer uma das veias periféricas;
2. Elegeu-se a veia mais adequada, de preferência as veias de pregas cotovelo;
3. Aplicou-se o garrote alguns centímetros do cotovelo, e pediu-se ao doente para abrir e fechar as mãos para favorecer a dilatação da veia;
4. Palpou-se as veias e identificou-se o lugar de punção;
5. Desinfectou-se o local de punção com algodão embebido em álcool a 70% de modo circular e do interior para a periferia;
6. Deixou-se o anti-séptico secar;
7. Desinfectou-se o dedo com o qual fez-se a palpação da área;
8. Após desinfectação da pele, realizou-se a punção venosa, usando uma seringa estéril e bem seca, à qual se acopla uma agulha;

*Grupo De Estudo "Uma Conversa Bíblica"*

*Programa Trimestral do ano 2008*

*IVº Trimestre*

A paz de Senhor esteja convosco! É com grande honra e júbilo que o *Grupo de Estudo Bíblico "Uma Conversa Bíblica"* apresenta o seguinte programa trimestral aos membros e demais irmãos.

<b>Encontro</b>	<b>Tema</b>	<b>Data</b>
1º	<i>O Serviço e Sacrifício</i>	30.11.08
2º	<i>A Graça</i>	21.12.08
3º	<i>Provações e Tentações</i>	18.01.09

➤ *E disse-lhes: Ide por todo o mundo, pregai o evangelho a toda a criatura (Mc16:15).*

*A Comissão*

9. Retirou-se a agulha da veia, e colocou-se um pedaço de algodão embebido em álcool no local da picada, para preveir reacções adversas;
10. Desinfectou-se a rolha de borracha do frasco com álcool. Aspirou-se o sangue e inoculou-se o frasco estéril,.

#### **Precaução**

- Não se deve refrigerar a amostra de sangue após a sua colheita;

### **5.2.2 Processamento das Amostras Biológicas**

#### **a) Urina**

#### **Técnica de Cultivo**

1. Numa das placas de petri, com o meio Agar CLED, Agar Sangue ou Agar MacConkey, inoculou-se a amostra de urina, fazendo uma tracinho para baixo, usando-se uma ansa de 2 $\mu$ l, previamente esterilizada à chama de bico de bunsen;
2. Suavemente deslizou-se a ansa com rapidez sobre a superfície do meio de cultura até estriar o espaço correspondente a um meio do total da placa;
3. Esterilizou-se a ansa e guardou-se no suporte para a ansa;
4. Incubou-se as placas na estufa a 37° C, durante 24 horas;
5. Após as 24 horas fez-se a leitura das placas.

## b) Fezes

### Técnica de Cultivo

1. Inoculou-se uma porção da amostra de fezes nas placas de Agar MacConkey e SS com uma ansa, previamente esterilizada na chama, fazendo um círculo no topo da placa;
2. Esterilizou-se a ansa, deixou-se arrefecer e fizeram-se as primeiras estrias, correspondentes a um terço do total da placa, sem voltar a colher a amostra estriou-se o segundo segmento, tocando no primeiro segmento onde se encontravam as bactérias já inoculadas. Para permitir que houvessem colónias isoladas, tocou-se com a ansa no segundo segmento, e faz-se as últimas estrias, permitindo que as bactérias fossem arrastadas para o terceiro segmento;
3. Num tubo com o meio de Agar selenite (meio de enriquecimento para *Salmonella* spp e *Shigella* spp) inoculou-se uma quantidade de fezes do tamanho do anel da ansa;
4. Incubou-se todos os meios na estufa a 37°C, durante 24 horas, altura que se fez a leitura, se após as 24 horas não houvesse crescimento nos meios de cultura de MacConkey e SS, faz-se uma subcultura (segundo dia, + 24 horas), usando o inóculo contido no tubo de selenite.

## c) LCR

### Técnica de Cultivo

1. Nas placas com os meios de cultura de Agar MacConkey e Agar Sangue semeiou-se o inóculo por meio de estrias, para permitir que as colónias estivessem isoladas e incubou-se a 37° C.;

2. Após 24 horas fez-se a primeira leitura e depois de 48 horas a segunda.

#### **d) Expectoração**

##### **Técnica de Cultivo**

1. Com uma zaragatoa, retirou-se uma porção da amostra, contida no frasco e inoculou-se nas placas de Agar Sangue, MacConkey e CLED, usando o método de estrias
2. Por volta de 18 a 24 horas, fez-se a leitura.

#### **e) Sangue**

##### **Técnicas de Cultivo**

1. Inoculou-se as amostras de sangue em garrafas com caldo nutriente enriquecido com Thioglycolate Broth ou Agar Muller-Hinton;
2. Incubou-se as garrafas a 37° C, durante 5 a 7 dias;
3. Após esse tempo, caso detecta-se a ocorrência de crescimento, repicou-se o caldo e fez-se uma sub-cultura, usando-se o método de estrias, em meios de cultura de Agar Sangue.

#### **5.2.3. Identificação das Enterobactérias**

Após o crescimento e isolamento, das bactérias das diferentes amostras acima mencionadas, procedeu-se à sua identificação usando a coloração de Gram (ver descrição da técnica no anexo), que as diferenciou em bactérias Gram positivas ou Gram negativas.

Feita a diferenciação das bactérias, caso elas fossem bactérias Gram negativas, efectuou-se a sua identificação usando a galeria API-E20 (descrição da técnica, anexo II), que é um sistema que permite a identificação das Enterobactérias e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos. A tabela 1 descreve as características morfológicas das Enterobactérias nos diferentes meios de culturas.

Tabela 1. Morfologia cultural das colónias de Enterobacteriaceae nos diferentes meios de cultura

Bactéria	Meios de cultura			
	Sangue	Mac Conkey	SS	CLED
<i>Salmonella</i> spp	1-3mm, cinzenta, húmida, elevada	1-3mm, incolor	1-3mm, incolor, com ou sem ponto preto no meio	Normalmente não cresce
<i>Shigella</i> Spp	1-3mm, cinzenta, húmida, elevada	<1-3mm, incolor	<1-3mm, incolor	Normalmente não cresce
<i>Escherichia coli</i>	1-3mm, cinzenta, húmida ou plana brilhante, as vezes $\beta$ -hemolítica	1-3mm, côr de rosa ou vermelhas, seca e plana	1-3mm, côr de rosa ou vermelhas.	1-3mm, verde claro.
<i>Proteus</i> Spp	1->3mm, cinzenta, húmida, elevada ou formigante as vezes $\beta$ -hemolítica	1-3mm, incolor, húmida, elevada	1-3mm, branca ou côr de rosa elevada, com ponto preto	1-3mm, verde brilhante
<i>Klebsiella</i> spp	1-4mm, cinzenta, mucosa, plana	1-4mm, côr de rosa, húmida ou mucosa elevada	Normalmente não cresce	1-4mm, côr de rosa, húmida ou mucosa plana

Outros coliformes	1-3mm, cinzenta, húmida ou mucoide, elevada, as vezes $\beta$ -hemolítica	1-3m, côr de rosa ou incolor, húmida ou mucoide, elevada ou plana	Normalmente não cresce	1-3mm, verde claro
-------------------	---	---	------------------------	--------------------

#### 4. Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

Tendo sido isolado e identificado o agente patogénico numa cultura pura, realizou-se o TSA, pelo método de difusão em Agar de Mueller-Hinton, que consistiu em expôr a bactéria à acção de vários agentes antimicrobianos para avaliar a sua sensibilidade aos mesmos.

##### Discos de Antibióticos

- ✓ Nitrofurantoina (300 $\mu$ g)
- ✓ Ciproflaxina (5  $\mu$ g)
- ✓ Gentamicina (30  $\mu$ g)
- ✓ Ampicilina (10  $\mu$ g)
- ✓ Ácido naldixico (30  $\mu$ g)
- ✓ Sulfametazol (125  $\mu$ g)

##### Técnica de Cultivo

1. Num frasco com soro fisiológico, inoculou-se uma colónia da bactéria isolada e identificada, misturou-se bem para obter uma suspensão homogénea;
2. Incubou-se o frasco onde se inoculo a colónia a testar, até que a sua turvação fosse igual ao do frasco com a concentração 0.5 da escala de MacFarland;

3. Identificou-se a placa de Agar Muller-Hinton;
4. Deitou-se a suspensão homogénea sobre a placa com Agar Muller-Hinton, de modo que ela se espalhasse sobre a mesma, e deixou-se repousar num papel absorvente durante pelo menos 2 minutos com a base virada para baixo, para permitir que todo o excesso da suspensão escorra;
5. Introduziu-se os discos assepticamente sobre a placa, permitindo que houvesse um bom distanciamento entre os discos;
6. As placas foram abertas apenas no momento em que se colocavam os discos, voltando a fechá-la até ao momento em que se colocava o próximo e assim sucessivamente, até que estivesse montado o antibiograma;
7. Evitou-se respirar, e muito menos falar, sobre a cultura quando as placas estavam abertas;
8. Incubou-se as placas a 37° C, durante 24 horas;
9. Mediu-se com uma régua o diâmetro das zonas de inibição de cada antibiótico;
10. Dependendo do diâmetro e para cada antibiótico, as bactérias foram classificadas em S-sensíveis, I-Intermédias ou R-resistentes (o anexo III descreve a valorização do tamanho da zona de inibição no teste de sensibilidade).



### 5.3. Resultados

Durante o período de estágio, isto é de Maio a Agosto de 2007, deram entrada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central de Maputo, um total de 1671 amostras, das quais 26 eram de expectoração, 157 de sangue, 370 de fezes, 451 de líquido céfalo-raquidiano e 667 de urina.

Tabela 2. Frequências absolutas e relativas dos casos positivos das amostras biológicas com o respectivo número de bactérias encontradas.

Amostra	Nº de casos negativos	Nº de casos positivos	% dos casos positivos	Bactéria identificadas
Expectoração	24	2	7,7	<i>K. pneumoniae</i>
Sangue	148	9	5,8	<i>Salmonella</i> spp <i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>Enterobacter</i> spp
LCR	447	4	0,9	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Proteus</i> spp
Fezes	351	19	5,1	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp <i>Shigella</i> spp

Nos 2 casos positivos de expectoração a bactéria encontrada foi a *K. pneumoniae*. Das 9 amostras de sangue positivas, encontrou-se 3 *Salmonella* spp, 3 de *K. pneumoniae*, 2 *E. coli* e 1 *Enterobacter* spp. Dos 4 positivas de LCR, 2 eram de *E. coli*, 1 de *K. pneumoniae* e 1 de *Proteus* spp e dos 19 casos positivos de fezes 17 pertenciam a *E. coli*, 1 a *Salmonella* spp e 1 a *Shigella* spp.

## Urina

Das 667 amostras de urina, que deram entrada no laboratório, 86 foram positivas, sendo 31 excluídas, por não apresentarem algumas das variáveis definidas para o estudo, tais como idade, sexo e/ou proveniência da amostra e 55 foram consideradas para o estudo.

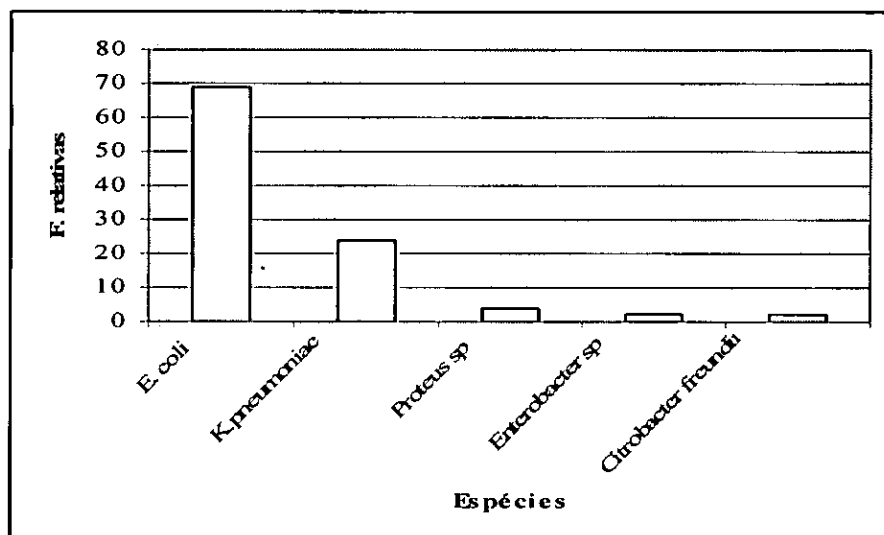


Figura 1. Frequência relativa das bactérias isoladas nas amostras de urina

Dos 55 casos positivos a *E. coli* foi a bactéria com elevada frequência (69%), seguida de *K. pneumoniae* (24%), *Proteus spp* (4%) e *Enterobacter spp* e *Citrobacter freundii* com a menor frequência (2%), conforme ilustra a figura 1.

Pelas tabelas abaixo (tabela 3) pode-se perceber que do total de 28 (100%) casos de bactérias presentes nas amostras do sexo masculino 64.3% eram de *E. coli*, 21.4% de *K. pneumoniae*, 7.1% de *Proteus spp* e 3.6% para *Enterobacter spp* e *C. Freundii*. Pela tabela 4 pode-se perceber que das 27 (100%) amostras do sexo feminino, somente a *E. coli* (74%) e *K. pneumoniae* (26%), foram encontradas.

**Tabela 3.** Valor absoluto e relativo das diferentes bactérias encontradas no sexo masculino

Bactéria	Nº de casos	%
<i>E. coli</i>	18	64.3
<i>K. pneumoniae</i>	6	21.4
<i>Proteus spp</i>	2	7.1
<i>Enterobacter spp</i>	1	3.6
<i>C. freundii</i>	1	3.6
Total	28	100

**Tabela 4.** Valor absoluto e relativo das diferentes bactérias encontradas no sexo feminino

Bactérias	Nº de casos	%
<i>E. coli</i>	20	74
<i>K. pneumoniae</i>	7	26
Total	27	100

Na tabela 5. verifica-se que as bactérias *E. coli* (88.9%), *k. Pneumoniae* (100%), *C. freundii* (100%) e *proteus spp* (100%) são encontradas com maior frequência em indivíduos na faixa etária de 0-8 anos de idade, enquanto que a *Enterobacter spp* encontra-se em 100% em indivíduos na faixa etária < 8 anos.

**Tabela 5.** Frequência de bactérias encontradas nas diferentes faixas etárias do sexo masculino.

Bactéria \ Idade	0-8 anos		< 8 anos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>E. coli</i>	16	88.9	2	11	18	100
<i>K. pneumoniae</i>	6	100	0	0	6	100
<i>Proteus spp</i>	2	100	0	0	2	100
<i>Enterobacter spp</i>	0	0	1	100	1	100
<i>C. freundii</i>	1	100	0	0	1	100

Do total de 20 casos de *E. coli* a faixa etária dos 0-8 anos de idade apresentou a maior percentagem (75%), assim como a *K. Pneumoniae* (57%) foi mais frequente na mesma faixa etária (tabela 6).

Tabela 6. Frequência de bactérias encontradas nas diferentes faixas etárias do sexo feminino.

Idade \ Bactéria	0-8 anos		< 8 anos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>E. coli</i>	15	75	5	25	20	100
<i>K. pneumoniae</i>	4	57	3	43	7	100

- Na variável idade separou-se os indivíduos em duas faixas etárias dos 0-8 anos de idade e < 8 anos de idade.

Analisando a tabela a baixo pode-se verificar que houve maior numero de bactérias nas amostras vindas das enfermarias do que da consulta externa. Isto é *E. coli* com 86.%, *K. Pneumoniae* 53.8% , *Proteus spp* 50%, *enterobacter spp* e *C. ferundii* com 100%.

Tabela 7. Relação entre as bactérias e a proveniência

Proveniência \ Bactéria	Enfermaria		Consulta externa		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>E.coli</i>	33	86.8	5	13.2	38	100
<i>K.pneumoniae</i>	7	53.8	6	46.2	13	100
<i>Proteus spp</i>	1	50	1	50	2	100
<i>Enterobacter spp</i>	1	100	0	0	1	100
<i>C. freundii</i>	1	100	0	0	1	100
Total	43		12		55	

### 5.3.1 Teste de Sensibilidade

Das bactérias identificadas nas amostras de urina, verificou-se que todas elas apresentavam resistência para as drogas ampicilina e Sulfametazol, conforme ilustrar a tabela abaixo.

Tabela 8. Percentagem Sensibilidade aos principais antimicrobianos testados para as bactérias isoladas nas amostras de urina.

Antibiótico Bactéria	Nitrof.	Ciprof.	Gent.	Ác. Nald.	Amp.	Sulf.
<i>E.coli</i>	Sens.	Sens.	Sens.	Resis.	Resis.	Resis.
<i>K. pneumoniae</i>	Sens.	Sens.	Sens.	Sens.	Resis.	Resis.
<i>Proteus spp</i>	Sens.	Sens.	Sens.	Resis.	Resis.	Resis.
<i>Enterobacter spp</i>	Resis.	Sens.	Sens.	Resis.	Resis.	Resis.
<i>C freundii</i>	Sens.	Sens.	Resis.	Resis.	Resis.	Resis.

Sens. Sensível

Resis. Resistente

### 5.4. Discussão dos resultados

#### Tipos de Enterobactérias presentes nas diferentes amostras.

#### a) Urina

Nas amostras de urina isolou-se as bactérias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp* e *C. freundii*. Segundo Murray *et al.*, (1998), provavelmente pelo facto das espécies originarem-se, em sua maioria no cólon, contaminar a uretra, ascender a bexiga e migrar para o rim ou para a próstata.

A espécie *E. coli* apresentou-se com maior frequência (69%). Estudos semelhantes feitos por Camargo *et al.*, (2002) ao avaliar a etiologia da infecção do trato urinário e a susceptibilidade das bactérias mais frequentemente isoladas da urina de pacientes

atendidos em Unidade de Saúde de Ribeirão Preto, verificou que a *E. coli* era a causa de 68% dos casos de infecção urinária e Segundo Koneman *et al.*, (2001) a *E. coli* é também a enterobactéria mais frequente nas infecções das vias urinárias.

Segundo Kazmircaz *et al.*, (2005) as restantes bactérias assim como a *E. coli*, pertencem a flora normal do intestino humano e podem colonizar certos locais quando as defesas do organismo estão comprometidas (inserção de cateteres, algália) e causar infecções extra-intestinais.

Em relação ao sexo e a idade, verificou-se que ambas as bactérias *E. coli* (69%) e *K. pneumoniae* (24%) eram mais frequentes em pacientes do sexo masculino na faixa etária dos 0-8 anos de idade, segundo Koneman *et al.*, (2001), Kazmircaz *et al.*, (2005) e Neto (2003) provavelmente pela maior incidência de mal-formações congénitas, mal-formação da uretra.

Atingida a fase adulta elas deixam de ser frequente no sexo masculino devido a factores anatómicos como a uretra mais longa, actividade bactericida do fluido prostático e ambiente periuretral mais húmido e passam a ser mais frequentes nos pacientes do sexo feminino, devido a má higiene perianal, actividade sexual que permite a migração das bactéria para a uretra e a bexiga (Neto, 2003).

Quanto a proveniência das amostras, constatou-se que as bactérias eram mais frequentes em amostras vindas das enfermarias do que aqueles que vinham das consultas externas. Provavelmente pela má higiene do próprio hospital que acaba contaminando os pacientes internados. Segundo Menezes *et al.*, (2005) e Chaves *et al.*, (2003) as infecções urinárias causadas pelas enterobactérias enquadram-se dentro dos 4 grupos de infecções hospitalares, devido a necessidade de instrumentação do trato urinário, tanto para o diagnóstico assim como para a drenagem da urina.

Os testes de sensibilidade apontaram para todas as bactérias, maior resistência as drogas ampicilina e sulfametazol, estes dados são confirmados por Chaves *et al.*, (2003), onde ao estudar o perfil de sensibilidade dos antimicrobianos utilizados em infecções urinárias de pacientes do hospital de referência São Lucas da cidade de Crateús, verificou uma resistência para Sulfametazol e ampicilina.

As bactérias *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Proteus spp* apresentaram sensibilidade as drogas nitrofurantoina, ciprofloxacina, ácido nalidixico e gentamicina.

A bactéria *Enterobacter sp* apresentou sensibilidade apenas para ciprofloxacina e gentamicina, e resistência a nitrofurantoina e ácido nalidixico. A bactéria *Citrobacter freundii* mostrou sensibilidade somente para nitrofurantoina e resistência a ciprofloxacina, gentamicina e ácido nalidixico. Os dados acima apresentados entram em concordância com os trabalhos feitos por Duarte *et al.*, (2002), onde estudou a infecção urinária na gravidez.

Segundo Folgosa e Martelli (1985), a resistência aos antibióticos, pode ser natural, isto é, os microorganismos possuem estruturas ou mecanismos de defesa contra os antibióticos, e pode também ser adquirida, o que é mais comum, uma vez que os indivíduos com alguma infecção tomam os antibióticos de forma errada, fazendo com que os microorganismos patogénicos criem mutações e ganhem resistência aos antibióticos.

#### **b) Sangue**

Segundo os resultados obtidos, as enterobactérias isoladas com maior frequência foram as *Salmonellas sp* e *Klebsiella pneumoniae*, provavelmente porque após a infecção oral por *Salmonellas*, estas invadem-se permaturamente na corrente sanguínea, enquanto que a *Klebsiella Pneumoniae* atinge a corrente sanguínea porque as defesas do organismo não são adequadas e é muito frequente em recém-nascidos que não apresentam o anticorpo IgM (Jawetz *et al.*, 1991).

#### **c) Expectoração**

Segundo Nester *et al.*,(1998) a *Klebsiella Pneumoniae* é o exemplo clássico de enterobactérias causadoras de pneumonias no trato respiratório, embora todas outras possam ser encontrada. Elas atacam o indivíduo em qualquer idade, especialmente quando as defesas do organismo são inapropriadas (imunocomprometidos).

#### **d) Fezes**

Nesta amostra foi possível encontrar com maior frequência a *E.coli*, segundo Murray *et al* (1998) as amostras foram colhidas em crianças com o sistema imune não muito bem desenvolvido, porque está é patogénica nessa idade e pode causar diarreias, embora ela pertença a flora intestinal normal.

#### **e) Líquido cefálo-raquidiano**

A enterobactéria encontrada com maior frequência foi a *Escherichia coli*, segundo Murray *et al* (1998) provavelmente pelo facto desta possuir alguns antígenos capsulares KI e é comum em crianças. Seguida a *Escherichia coli* veio a *Klebsiella pneumoniae* que atinge pessoas debilitadas e malnutridas, principalmente alcoólatras crónicos porque o organismo produz polissacarídeo capsular em abundância e apresenta dificuldades em expelir através do sistema respiratório. A pneumonia causada por ela frequentemente envolve distúrbios necróticos dos espaços alveolares e pode levar a formação de cavidades (Murray *et al.*, 1998).

### **6. Análise crítica da unidade de estágio**

A unidade onde se realizou o estágio, executa as análises seguindo as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), porém verificou-se algumas lacunas na preparação dos meios de cultura, por falta de alguns instrumentos como é o caso do medidor do PH e o distribuidores.

Verificou-se uma grande contaminação das amostras de urina, por falta de uma orientação aos pacientes de como devem ser colhidas e quanto tempo depois da sua colheita a amostra deve permanecer o paciente antes de ser processada. Verificou-se ainda nas requisições, que alguns clínicos não informam ao laboratório a idade, estado fisiológico, o sexo do doente, assim como foi colhida a amostra.

No que diz respeito ao processamento das amostras, verificou-se uma grande demora, o que acaba influenciando no diagnóstico laboratorial. As amostras de urina ficam mais



de 2 horas antes de ser processadas e muito menos são refrigerada (o que diminuiria muito o crescimento microbiano). Isto deve-se ao facto de que o técnico que faz as colheitas ser o mesmo que deve processá-las.

Para a realização do teste de sensibilidade verificou-se a ausência de pacrimetro para medir o diametro do halo de inibição do antibiótico.

Durante o período de estágio, verificou-se a escassez de luvas no laboratório, o que propociona um risco para a saúde do técnico, que muitas vezes colhe e processa as amostras em contacto directo com as mãos. E quando houvesse luvas os técnicos usavam a mesma luva para colher (por exemplo amostra de sangue) em doentes diferentes.

## 7. Conclusões

É importante ter em mente que, o Laboratório de Microbiologia desempenha um papel preponderante no diagnóstico e controle das doenças infecciosas.

A escolha do estágio como forma de culminação de curso foi bastante importante, porque o estagiário pode aprender um pouco mais através da prática e conciliar com os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso, podendo desenvolver habilidades técnicas, profissionais, responsabilidade, capacidade de adaptação e de trabalhar em equipa, qualidades estas que possam encamilha-lo para o mercado do trabalho.

Apesar de algumas dificuldades que foram surgindo em algum momento do estágio foi possível alcançar os objectivos traçados no período determinado.

Com o estágio tive a percepção correcta de que as infecções urinárias causadas pelas enterobactérias (principalmente a *E. Coli*) são mais frequentes em crianças do sexo masculino e que as bactérias apresentam uma grande resistência aos antibióticos Ampicilina e Sulfametazol.

## 8. Recomendações

Recomenda-se ao laboratório a adquirir os instrumentos necessários para a preparação dos meios de cultura, de forma a melhorar a qualidade de diagnóstico.

Recomenda-se a Direcção do laboratório a comprar luvas suficientes e aos técnicos a descartar as luvas sempre que for atender um novo doente.

Recomenda-se a Direcção do laboratório a comprar o pacrimetro, para permitir que os resultados da leitura da sensibilidade seja fiável.

Recomenda-se a Direcção do Laboratório a aumentar o número de técnicos especializados na área de laboratório, para que enquanto uns ficam na sala de colheita, outros fiquem a processar as amostras trazidas das enfermarias e de casa.

Recomenda-se a Direcção do Laboratório a desenvolver normas de colheita, transporte adquado das amostras e que se fixem na vitrin da sala de recepção das mesmas. Deve

ainda orientar aos clínicos a preencherem todos os dados necessários nas requisições de forma a facilitar o técnico no diagnóstico.

## 9. Bibliografia

Anónimo, (1956). *Serviços de Saúde em Moçambique*, Lourenço Marques, Editora Imprensa Nacional de Moçambique.

Camargo, C. B. S., C. C. Pedro, D. S. Lourenço, R. H. A. Gironi e R. Martnez (2002). *Infeções de Vias Urinárias na Comunidade de Ribeirão Preto-SP: Etiologia, Sensibilidade Bacteriana a Antimicrobianos e Implicações Terapêuticas*. 173-178 pp. Ribeirão Preto.

Chaves, J. M., E. A. Menezes, A. A. Moreira, F. A. Cunha e T. M. J. P. Carvalho. (2003). *Perfil de Sensibilidade dos Antimicrobianos Utilizados em Infecções Urinárias de Pacientes do Hospital de Referência São Lucas da Cidade de Crateús-Ceará*. C. C. C. C Vol.15. 81-83 pp.

Cheesbrough, M. (1984). *Medical Laboratory Manual For Tropical Countries*, volume II. APRIL 478 pp.

Duarte, G. A., C. Marcolin, C. V. Gonçalves, S. M. Quitana, A. T. Berezowski, A. A. Nogueira e S. P. Cunha (2002) *Infecção Urinária na Gravidez: Análise dos Métodos de Diagnóstico e do Tratamento*. Vol. 24. 471-477 pp. Ribeirão Preto. RBGO

Folgosa, E. M. P. e A. Martelli (1985). *Bacteriologia Médica: Manual de Laboratório*. 204 pp. Maputo, Ministério da Saúde.

Folgosa, E. M. P e J. Mondlane (2005). *Manual de Práticas de Microbiologia*. 3º edição. 62 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

Fonseca, A. B., C. Sebastião, F. J. C. Ribeiro, I. Calheiros, L. M. Lito, M. B. Abecassis, M. I. F. Pinto, M. O. C. Spencer, M. P. S. F. M. Pinheiro, M. T. M. P. M. Costa, R. M. Barros e A. F. Bento (2004). *Orientações para Elaboração de um Manual de Boas*

*Práticas em Microbiologia*, Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI). 193 pp, Portugal, Instituto Nacional de Saúde .

Jawtz, E., J. L. Melink, A. E. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel e A. S. Morse (1991). *Microbiologia Médica*. 19ª edição. 519 pp, Rio de Janeiro, Guanabara koogan.

Kazmirczak, A., F. H. Giovelli e L. S. Goulart (2005) *Caracterização das Infecções do Trato Urinário: Diagnosticadas no Município de Guarani das Missões –RS*. Vol 37. 205-207 pp. RBAC.

Koneman, W. E, S. D. Allen, W. M. Juavada, P. C. Schechenberg e W. C. J. Winner (2001) *Diagnóstico Microbiológico, Textos e Altas Coloridos*, 5ª edição. Rio de Janeiro, Brazil, Editora Médica e Científica.

Langa, J. S. (2006). *Avaliação da Frequência das Espécies de Microorganismos Patogénicos, no Material Biológico de (Sangue, Urina, Exudato Vaginal e LCR) Analisado no Laboratório de Análises Clínicas do HCM*. 35 pp, UEM. Maputo-Moçambique.

Marshall, Jacquelyn R. (1995). *Microbiologia: Manual de Laboratório Clínico*. 161 pp. São Paulo, Livraria Santos.

Menezes, E. A., K. C. Lima, F. A. Cunha, M. R. F. Ângelo, M. N. C. Salviano e I. R. N. Oliveira. (2005). *Infecções Hospitalares Urinárias Causadas por Enterococcus Faecalis na Cidade de Fortaleza*. Vol. 37. 65-67 pp.

Murray, P. R., K. S. Rosenthal, G. S. Kobayashi e M. A. Pfaller (1998). *Microbiologia Médica*. 3ª edição, 719 pp. Rio de Janeiro, Guanabara koogan.

Nester, E. W., C. E. Roberts, N. N. Pearsall, D. G. Anderson e M. T. Nester (1998). *Microbiology: A Human Perspective*, 2ª edição. 848 pp, United States of America, WCB/McGraw-Hill.

Neto, O. M. V., (2003) *Infecção do Trato Urinário*. 365-369 pp. Ribeirão Preto.

Walters, N. J., B. H. Estridge e A. P. R. Reynolds (1997). *Laboratório Clínico: Técnicas Básicas*. 3ª edição. 482pp. Porto Alegre, ARTMED.

Sartori, M. R. K. (2005). *Actividade Microbiana de Fracções de Extratos e Compostos Puros Obtidos das Flores de Acmela brasiliensis Spreng (Widelia paludosa) (Asteraceae)*. 21.22 pp. Itajai.

Segala. X. (1998). *Manual de Colheitas das Amostras*, 37 pp, Hospital José Macamo. Maputo.

## ANEXOS

## **Anexo I**

### **Coloração de Gram**

#### **Procedimentos**

1. Suspendeu-se uma pequena porção da amostra bacteriana a ser corada em uma gota de água ou solução salina, usando uma alça bacteriológica flambada, sobre uma lâmina de microscópico, espalhando a gota;
2. Deixou-se o material secar e, em seguida, fixou-se com calor, flambando rapidamente a lâmina acima da chama de bico de Bunsen;
3. Cobriu-se toda a superfície da lâmina com o corante cristal violeta;
4. Deixou-se em repouso por um minuto;
5. Lavou-se a lâmina com água para remover o excesso da solução de cristal violeta, mantendo a lâmina em posição oblíqua, com cuidado para não deixar formar poça;
6. Cobriu-se o esfregaço com solução de lugol durante um minuto;
7. Descorou-se o esfregaço usando uma solução de álcool – acetona;
8. Deixou-se sobre a lâmina por 30 segundos;
9. Cobriu-se o esfregaço com solução de safranina, durante 30 segundos;
10. Lavou-se levemente com água corrente;
11. Esperou-se a lâmina secar naturalmente ao ar livre, ou enxugou-se delicadamente com papel filtro, através de leve compressão do mesmo sobre a lâmina.



## **Anexo II**

### **Galeria API 20E**

#### **a) Preparação da galeria**

1. Preparou-se uma câmara de incubação com uma tampa correspondente e espalhou-se água corrente nos alvéolos, para proporcionar uma atmosfera húmida.

#### **b) Preparação do inoculo**

1. Com ajuda de uma ansa, recolheu-se 1 a 2 colónias isoladas da placa onde se encontrava a cultura;
2. Colocou-se a (s) colónia (s), num tubo contendo, mais ou menos 5ml de água destilada;
3. Realizou-se a homogeneização da suspensão.

#### **c) Inoculação na galeria**

1. Usando uma pipeta de Pasteur, encheu-se completamente as cúpulas dos testes CIT, VP e GEL, com a suspensão do inoculo;
2. Encheu-se até a metade, com a mesma suspensão as restantes cúpulas;
3. Adicionou-se óleo de parafina as cúpulas dos testes, ADH, LDC, URE e H<sub>2</sub>S, para obter uma condição de anaerobiose;
4. Fechou-se a câmara de incubação e incubou-se a 37°C, durante 18-24 horas.

**d) Leitura da galeria**

Depois de 18-24 horas adicionou-se os reagentes de revelação, usando-se os respectivos reactivos, do seguinte modo:

1. Teste VP: adicionou-se uma gota de VP1 e VP2 (esperou-se 10 minutos);
2. Teste TDA: adicionou-se uma gota do reactivo TDA (reação imediata);
3. Teste IND: adicionou-se uma gota do reactivo IND (esperou-se 2 minutos);
4. Leu-se a galeria com ajuda da tabela de leitura do teste;
5. Anotou-se os resultados na folha de identificação do API;
6. Com base nos resultados obtidos, comparou-se com os códigos existentes no catálogo Analítico API 20E.

### Anexo III

A tabela abaixo, descreve a valorização do tamanho da zona de inibição no teste de sensibilidade aos antibióticos.

Tabela 1. Padrão de sensibilidade dos antibióticos

Antibiótico	Zona de interpretação do diâmetro de inibição (mililitros)	
	Resistente	Sensível
Ampicilina	$\leq 13$	$\geq 17$
Sulfametazol	$\leq 10$	$\geq 16$
Ciprofloxacina	$\leq 15$	$\geq 21$
Ácido Nalidixico	$\leq 13$	$\geq 19$
Nitrofurantoina	$\leq 14$	$\geq 17$
Gentamicina	$\leq 12$	$\geq 15$