Semeadura Primária de Amostras Biológicas em Laboratório de Microbiologia

Renata Ribeiro Sousa Silva

Resumo

Este trabalho apresenta padronização adotada em dois hospitais da região sudoeste do interior de Goiás, para semeadura primária de amostras biológicas que rotineiramente adentram estes laboratórios de microbiologia.
Os hospitais em questão são de atendimentos bem distintos, sendo um publico, de atendimento exclusivo ao SUS, recebendo em sua maioria paciente pós-trauma. O outro de atendimento particular, para pacientes de todas as especialidades. Ambos com UTI. Embora sejam estabelecimentos diferentes, foi possível e até fácil implantar essa padronização.
O adotado para culturas quantitativas de urina, é semear em Agar Cromogênico, de lavado brônquico, lavado broncoalveolar, aspirado/secreção traqueal semear, após diluição em Agar Chocolate, Agar Sangue e Agar MacConkey, e ponta de cateter semear em Agar Sangue. Para as culturas qualitativas de líquidos cavitários semear em frasco de hemocultura para volumes acida de 3,0 mL e para volumes menores em geral no Agar Chocolate, Agar Sangue e Agar MacConkey, de líquor, swabs de secreções, amostras de pele e tecido subcutâneo semear na maioria dos casos em Agar Chocolate, Agar Sangue e Agar MacConkey, de fragmento de tecido ósseo em meio líquido de Tioglicolato, e de sangue, que necessita de cuidas especiais para coleta, semear em meio próprio para hemocultura. E ainda para as culturas de vigilância, semear swab anal em enterococosbac ou enterococosel, e swab nasal em Agar manitol.
Com esse trabalho foi facilitada a continuidade do exame pelo microbiologista, garantindo mais qualidade, segurança e diminuição de tempo na liberação dos laudos.

Introdução

Este trabalho foi realizado em dois laboratórios de hospitais da região sudoeste de Goiás. Portanto o funcionamento destes laboratórios é de 24 horas.

Sendo assim semeadura de amostras necessita ser realizadas por todos profissionais do laboratório, uma vez que chegam a qualquer momento, e não apenas por profissional especializado.

Então este trabalho foi apresentado para facilitar o manuseio e processamento das amostras que rotineiramente entram para realização de cultura.

Objetivo

Padronizar a semeadura primária das amostras biológicas que rotineiramente chegam aos laboratórios.

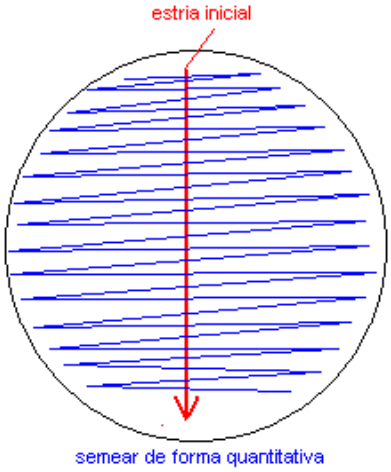
Procedimentos Inicias

-Todos os procedimentos deverão ser realizados dentro da cabine de segurança biológica, ou ao menos em capela com Bico de Bunsen, para evitar contaminação da amostra e do manipulador.

- Desinfetar a superfície de trabalho com álcool a 70%, ligar a luz UV ou Bico de Bunsen e deixar ao menos 15 minutos antes de utilizar.
- Fazer o mesmo processo após o uso.
- As amostras não devem entrar em contato com a luz UV.
- Retirar as placas e deixar 15 minutos em temperatura ambiente. Estas deverão ser selecionadas de acordo com o tipo de amostra a ser semeada.
- Esterilizar a pinça e alças que for utilizar antes e após o uso, e principalmente entre cada procedimento.
- As placas devem ser identificadas na parte onde contém o Agar (e não na tampa) com o nome, prontuário, data de semeio e material que está sendo semeado.
- Deve ser incubada invertida.

-A jarra de tensão de CO_2 quando necessária deve ser utilizada com uma vela acesa.

Semeadura quantitativa



Lavado Brônquico e Lavado Bronco alveolar

- Homogeneizar o material em agitador tipo vórtex.
- Diluir a amostra 1/10 em solução fisiológica (0,1 ml da amostra em 0,9 ml de solução fisiológica).
- Semear 10 µl do material, sem centrifugação, em Agar chocolate, Agar sangue e Agar MacConkey pela técnica de semeadura quantitativa.
- Incubar a 35+-2ºC, sendo Aguar chocolate e Agar sangue em jarra de tensão de CO_2.
- Fazer uma lâmina do material, se houver solicitação para pesquisa de BAAR/BK fazer três lâminas.

*** Lâmina**

- Centrifugar parte do material em tubo cônico estéril de 2.500 a 3.000 rpm por 15 a 20 minutos.
- Após a centrifugação, remover o sobrenadante com uma pipeta (seringa) estéril, deixando aproximadamente 0,5 ml de sedimento.
- Ressuspender o sedimento e colocar uma gota em uma lâmina limpa e desengordurada e deixar secar em temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Aspirado/Secreção Traqueal

- Usando seringa, aspirar 1,0 ml da amostra, colocar em tubo estéril com tampa, adicionar 1,0 ml agente mucolítico (Xarope diluído 1/10).
- Tampar o frasco homogeneizar a amostra em agitador tipo vórtex.
- Deixar a amostra em repouso por 15 minutos.
- Em outro tubo estéril fazer uma diluição 1/10 com soro fisiológico da diluição anterior.
- Homogeneizar e semear 10 µl da diluição final em Agar chocolate, Agar sangue e Agar MacConkey pela técnica de semeadura quantitativa.
- Incubar a 35+-2°C, sendo Agar sangue e Agar chocolate em jarra de tensão de CO_2.
- Fazer uma lâmina, se houver solicitação para pesquisa de BAAR/BK fazer três lâminas.

*** Lâmina**

- Com auxílio de alça bacteriológica pegar uma porção purulenta da secreção/aspirado.
- Rolar essa porção na parede do frasco para separar do material salivar.
- Em seguida, colocar o material na extremidade de uma lâmina limpa confeccionando um esfregaço delgado.
- Deixar secar a temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Urocultura

- Homogeneizar o material manualmente.
- Semear 1,0 µl do material, sem centrifugação, em Agar cromogênico pela técnica de semeadura quantitativa.
- Incubar a 35+-2ºC.
- Fazer uma lâmina do material.

*** Lâmina (GRAM de Gota)**

- Colocar uma gota do material, sem centrifugar, em uma lâmina limpa e desengordurada e deixar secar em temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar

Semeadura Qualitativa

Amostras coletadas com Swab (Secreções de ferida etc.)

- Quando vier dois swabs, utilizar um para o semeio, este deverá ser rolado sobre os meios de cultura, seguindo a sequência dos mais ricos para os mais seletivos (Agar chocolate, Agar sangue e Agar MacConkey).
- Quando somente um swab for coletado, suspende a amostra do swab em um pequeno volume de solução fisiológica estéril (0,5 ml), agitar vigorosamente, cumprimi-lo na parede do tubo e utilizar esta suspensão para a semeadura nos meios.
- Semear por esgotamento com alça estéril em: Agar chocolate, Agar sangue e Agar MacConkey.
- Incubar a 35+-2°C, sendo Agar sangue e Agar chocolate em jarra de tensão de CO_2.

*** Lâmina**

- Quando vierem dois swabs utilizar um para a confecção da lâmina.
- Quando vier apenas um swab utiliza-lo para a confecção da lâmina após suspende-lo em soro fisiológico, como citado acima.
- Deixar secar a temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Aspirados, exsudatos e secreções (em seringa ou frasco)

- Materiais recebidos em seringas devem ser transferidos para um tubo estéril.
- Homogeneizar a amostra e semear por esgotamento em Agar chocolate, Agar sangue e em caldo tioglicolato.
- Incubar a 35+-2°C, sendo Agar sangue e Agar chocolate em jarra de tensão de CO_2.

- Fazer uma lâmina.

*** Lâmina**

- Selecionar a porção mais purulenta ou mucosa com seringa de 1,0 ml ou alça bacteriológica.
- Amostras muito espessa ou muito purulentas podem ser diluídas com uma gota de salina estéril e espalhadas sobre uma grande área da lâmina formando um esfregaço delgado.
- Deixar secar a temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Fragmento de tecido

- Colocar o material em uma placa de Petri estéril.
- Fragmentar com auxílio de um bisturi.
- Semear os fragmentos por esgotamento em Agar chocolate e Agar sangue. Transferir um fragmento para o caldo de tioglicolato. Em amostras grandes (ex.: hálux), que não possam ser colocados em caldo de tioglicolato e que tenha sido acondicionados em frasco estéril, adicionar 10 a 20 mL do caldo tioglicolato ou volume suficiente pra que o fragmento esteja submerso no meio.
- Incubar a 35+-2°C, sendo Agar sangue e Agar chocolate em jarra de tensão de CO_2.
- Fazer uma lâmina do material.

*** Lâmina**

- Pegar um fragmento com a pinça estéril e preparar os esfregaços fazendo vários imprints numa lâmina limpa.
- Deixar secar a temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Fragmento ósseo/ Parafuso e outros

*O material deve vir acondicionado em solução fisiológica estéril.

- Transferir o material para o tioglicolato, ou caso o material seja grande, não sendo possível transferi-lo, colocar caldo tioglicolato em volume suficiente para que o material esteja submerso no próprio frasco coletor.
- Incubar a 35+-2°C.

*** Lâmina**

- Fazer uma lâmina a partir da solução fisiológica.
- Deixar secar a temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar

Líquido Céfalo Raquidiano (Líquor)

- Separar parte do material em tubo estéril com tampa. Centrifugar à 3000 rpm/15 min. Remover o sobrenadante (utilizar para bioquímica) e suspender o sedimento.
- Semear o sedimento por esgotamento em Agar chocolate e Agar sangue. Inocular uma porção em caldo tioglicolato.
- Incubar a 35+-2°C, sendo Agar sangue e Agar chocolate em jarra de tensão de CO_2.
- Fazer uma lâmina do material, se houver solicitação para pesquisa de BAAR/BK fazer três lâminas.

***Lâmina**

- Retire 10 µl do sedimento e colocar em uma lâmina, sem espalhar.
- Para aumenta a concentração do líquido (quando este estiver límpido após a centrifugação), adicionar uma segunda gota do sedimento na mesma área onde foi colocado o material anteriormente.
- Demarcar a área onde está o material.
- Deixar secar em temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Líquidos Cavitários (Pleural, ascítico, peritoneal, diálise e sinovial)

* Volume < 3,0 mL semear em placas

- Separa parte do material em um tubo estéril com tampa. Centrifugar à 3000 rpm/15 min.
- Remover o sobrenadante e suspender o sedimento.
- Semear o sedimento por esgotamento de acordo com o líquido:

. <u>Líquido pleural</u>: Agar chocolate, Agar sangue e caldo tioglicolato.

. Líquido ascítico: Agar sangue e caldo tioglicolato.
. Líquido peritoneal: Agar sangue e Agar MacConkey.
. Líquido de diálise: Agar sangue, Agar MacConkey e caldo tioglicolato.
. Líquido sinovial: Agar chocolate, Agar sangue e caldo tioglicolato.
- Incubar a 35+-2°C, sendo Agar sangue e Agar chocolate em jarra de tensão de CO_2.
* Volume > 3,0 mL
- Semear de 2 a 4 ml do líquido em frasco de hemocultura pediátrico.
- Fazer uma lâmina do material, se houver solicitação para pesquisa de BAA/BK fazer três lâminas.

***Lâmina**

- Em líquidos turvos ou purulentos, fazer a lâmina direta do material.
- Em líquidos límpidos, centrifugar à 3000 rpm/15 min. Remover o sobrenadante e suspender o sedimento. Fazer a lâmina do sedimento.
- Deixar secar em temperatura ambiente.
- Fixar no calor brando antes de corar.

Cultura de vigilância

* Não é necessário fazer lâmina.

SWAB NASAL (Pesquisa de MRSA)

- Semear por esgotamento em Agar Manitol.
- Incubar a 35+-2°C.

SWAB RETAL (Pesquisa de VRE)

- Fazer uma suspensão do swab em 0,5 ml de salina estéril. Agitar vigorosamente e comprimir o swab na parede do tubo.
- Utilizar esta suspensão para o semeio.
- Semear por esgotamento em Agar Enteroscocosbac ou Agar Enterococosel ou ainda na falta destes, Agar sangue
- Incubar a 35+-2° C.

Ponta de Cateter

-Material deve vir em tubo estéril e seco.
- Retirar o cateter do tubo com o auxílio de uma pinça estéril (cortar o cateter se este for maior que 5 cm), colocar no meio de Agar sangue, e rolar o cateter por toda a superfície do meio para frente e para trás, duas vezes (Técnica de Maki et al).
- Incubar a 35+-2°C em jarra de tensão de CO_2.

*Não é necessário fazer lâmina.

***O ideal é vir acompanhada de uma hemocultura periférica e outra colhida do cateter.**

Hemocultura

***Orientações:**

-Devem ser coletadas no mínimo duas amostras de hemocultura.
- Não colher no pico febril.
- Dar preferência à amostra venosa.
- Coletar o máximo de volume possível, respeitando o volume de cada frasco, pois quanto maior o volume de sangue, maior a probabilidade de isolar um possível patógeno.
. Probac/Hemobac adulto: 5 a 10 mL
. Probac/Hemobac infantil: 1 a 5 ml
- Quando ocorrer a coleta de outros exames além da hemocultura, colocar primeiramente o sangue no frasco de hemocultura.
- Cada amostra deve ser coletada de punções separadas e de sítios anatômicos diferentes. Vários frascos com sangue de uma mesma punção são considerados uma mesma amostra ou cultura de sangue.
- As hemoculturas, preferencialmente, não devem ser coletadas a partir de cateter, exceto para diagnóstico de infecção relacionada ao dispositivo (quando for solicitado pelo médico). Neste caso, a amostra obtida através de cateter deve ser sempre acompanhada por uma ou duas amostras de veia periférica, de forma seqüencial ou concomitante, identificando corretamente as amostras quanto ao local de punção.

- A antissepsia adequada da pele é parte fundamental do processo e é o fator que determina a probabilidade de uma hemocultura positiva ser considerada contaminação ou infecção.

***Coleta**

- Lavar as mãos com água e sabão.
- Preparar o material, dispor a etiqueta de identificação no frasco, anotando o nome do paciente, data, hora e local de coleta (sítio anatômico), imediatamente ao procedimento.
- Limpar a tampa de borracha com algodão embebido em álcool 70%. Manter o algodão sobre o frasco até o momento da punção ou proceder conforme as instruções do fabricante.
- Escolher o melhor local de punção para a coleta de sangue. Colocando o garrote e apalpando livremente as veias do paciente para escolher a mais calibrosa e menos móvel. Soltar o garrote.
- Fazer a antissepsia com álcool 70%, friccionando a pele em círculos semiabertos a partir do pondo a ser puncionado. Esperar secar por 30 segundos. Repetir o procedimento mais duas vezes. Não voltar a tocar o local onde foi feita a antissepsia. Se houver contaminação ou suspeita de contaminação da área, repetir o procedimento de antissepsia.
- Colocar novamente o garrote e puncionar a veia com agulha e seringa ou dispositivo para coleta a vácuo, sem tocar diretamente no local de punção.
- Coletar de 5 a 10 ml de sangue (adultos) ou de 1 a 5 ml de sangue (crianças) para cada frasco.
- Ao retirar agulha, fazer compressão local com algodão seco, sem flexionar o braço.
- Transferir a amostra para os frascos de hemocultura.
- Dispensar o material de punção em local apropriado (caixa de perfuro-cortante).
- Lavar as mãos.

***Repetir o procedimento para cada coleta de hemocultura.**

Se a amostra for obtida a partir de cateter vascular, dever ser realizada a antissepsia do local a ser puncionado com álcool 70% (dispositivo) conforme instruções acima. Não é necessário descartar o volume inicial de sangue ou lavar o acesso com salina para eliminar heparina ou outros anticoagulantes, pois a alta concentração protéica dos meios de cultura normalmente neutraliza o efeito antimicrobiano eventual do anticoagulante.
Além disso, o descarte do volume inicial de sangue do cateter com o intuito de evitar contaminação é assunto controverso e essa prática ainda é realizada em muitas instituições, mesmo nas pediátricas, onde o volume de sangue é ponto crítico. Porém, estudo realizado por Dwiveidi e col., em 2009, demonstrou que o descarte da alíquota inicial não diminui a chance de contaminação da amostra, tornando essa prática desnecessária.

***Inoculação em meio de cultura (laminocultivo) – para meios da Probac**

-Deve ser feita dentro da cabine de segurança biológica junto ao Bico de Bunsen ou fluxo laminar, diminuindo o risco de contaminação.
-Retirar o lacre plástico transparente do pote e desrosquear a tampa sem tirá-la por completo.
- Para colocar o laminocultivo tirar a tampa inferior. Retirar a tampa que já foi desrosqueada do pote e encaixar o laminocultivo até o completo encaixe no frasco. Certifique-se que a tampa de rosca do laminocultivo esteja firmemente rosqueada.

Conclusão

Portanto o que padronizamos pode ser visto na tabela a seguir:

Semeadura de amostras		
Material	Meio de cultura a ser semeado	Lâminas
Urina	Meio cromogênico	Uma
Hemocultura	Hemobac Trifásico / Probac	--
Ponta de cateter	Agar Sangue	--
Líquor (centrifugar)	Agar Sangue, Agar Chocolate e Tioglicolato	Uma
Líquidos cavitários: Líquido de diálise Líquido pleural Líquido amniótico Líquido sinovial Líquido peritoneal	Centrifugar e semear conforme o líquido: Agar Sangue, Agar MacConkey e Tioglicolato Agar Chocolate, Agar Sangue e Tioglicolato Agar Chocolate, Agar Sangue e Tioglicolato Agar Chocolate, Agar Sangue e Tioglicolato Agar Sangue e Agar MacConkey	Uma lâmina do material centrifugado.
Aspirado/Secreção traqueal (diluir com fluimicil 1/10)	Agar Chocolate, Agar Sangue e Agar MacConkey	Uma
Lavado/Escovado brônquico e lavado broncoalveolar (diluir em soro fisiológico 1/10).	Agar Chocolate, Agar Sangue e Agar MacConkey	Uma
Cultura de vigilância Swab nasal Swab retal	 Agar Manitol Agar Enterococosel ou Agar Enterococosbac	 – --
Swab de secreção	Agar Chocolate , Agar Sangue e Agar MacConkey	Uma
Culturas de amostras de pele e tecido subcutâneo: Swab (secreção) Seringa Fragmento de tecido	 Agar Chocolate, Agar Sangue e Agar MacConkey Agar chocolate, Agar sangue e caldo tioglicolato Agar chocolate, Agar sangue e caldo tioglicolato	Uma
Fragmento de tecido ósseo	Caldo tioglicolato	Uma

Bibliografia

BRASIL. Ministério da Saúde. Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica, Módulo 1. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Principais Síndromes Infecciosas, Módulo 3. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame a análise microbiológica e laudo final, Módulo 4. Brasília, DF, 2009.

OPLUSTIL,C.P.; , C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. – Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3ª Ed., São Paulo, Saveir, 2010.