

Manual de coleta e transporte de espécimes clínicos e ambientais para diagnóstico laboratorial de patógenos bacterianos envolvidos em DTA e DDA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Articulação Estratégica
de Vigilância em Saúde

Manual de coleta
e transporte
de espécimes
clínicos e
ambientais
para **diagnóstico
laboratorial
de patógenos
bacterianos
envolvidos
em DTA e DDA**



2022 Ministério da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: bvms.saude.gov.br.

Tiragem: 1ª edição – 2022 – versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde

Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública

SRTVN, quadra 701, via W5 Norte, lote D, Edifício PO 700, 6º andar

CEP: 70719-040 – Brasília/DF

Site: <https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/>

acoes-e-programas/sislab

E-mail: cglab.coordenacao@saude.gov.br

Organização:

Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções

Bacterianas/IOC/Fiocruz/RJ:

Dália dos Prazeres Rodrigues

Elizabeth Cristina dos Prazeres Rodrigues

Emily Moraes Roges

Ernesto Hofer

Renata Garcia da Costa

Verônica Dias Gonçalves

Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública/

Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em

Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde:

Thiago Ferreira Guedes

Lúcia Helena Berto

Revisão técnica:

Dália dos Prazeres Rodrigues

Elizabeth Cristina dos Prazeres Rodrigues

Emily Moraes Roges

Ernesto Hofer

Renata Garcia da Costa

Verônica Dias Gonçalves

Diagramação:

Fred Lobo – Área Editorial/Necom/GAB/SVS

Normalização:

Delano de Aquino Silva – Editora MS/CGDI

Revisão textual:

Tamires Felipe Alcântara – Editora MS/CGDI

Tatiane Souza – Editora MS/CGDI

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde.

Manual de coleta e transporte de espécimes clínicos e ambientais para diagnóstico de patógenos bacterianos responsáveis por DTA e DDA [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022.

35 p. : il.

Modo de acesso: http://bvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_coleta_especimes_clinicos_ambientais.pdf

ISBN 978-65-5993-300-6

1. Doenças transmitidas por alimentos. 2. Disenteria. 3. Manejo de espécimes. I. Título.

CDU 616.3

Catalogação na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2022/0212

Título para indexação:

Guidelines on collection and transport of clinical and environmental specimens for diagnosis of bacterial pathogens from Diarrheal Diseases and Foodborne Diseases

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
ASPECTOS CLÍNICOS DOS PATÓGENOS PREVALENTES NAS DDA E DTA	8
Família Staphylococcaceae	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
Família Vibrionaceae	9
Gênero <i>Vibrio</i>	9
<i>V. cholerae</i>	9
<i>V. parahaemolyticus</i>	10
<i>V. vulnificus</i>	10
Ordem Enterobacterales	11
Família Enterobacteriaceae	11
Gênero <i>Salmonella</i>	11
Gênero <i>Shigella</i>	12
Gênero <i>Escherichia</i>	12
EPEC – <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica	13
EIEC – <i>E. coli</i> enteroinvasiva	13
ETEC – <i>E. coli</i> enterotoxigênica	13
STEC – <i>E. coli</i> produtora de Shiga-toxina	14
EaggEC – <i>E. coli</i> enteroagregativa	14
DAEC – <i>E. coli</i> aderência difusa	14
AIEC – <i>E. coli</i> aderente-invasiva	15
EAHEC – <i>E. coli</i> enteroagregativa-hemorrágica	15
Gênero <i>Yersinia</i>	15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15
Família Campylobacteraceae	16
Gênero <i>Campylobacter</i>	16

Família Aeromonadaceae	17
Gênero <i>Aeromonas</i>	17
Ordem Enterobacterales	18
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	18
Família Listeriaceae	18
<i>Listeria monocytogenes</i>	18
IMPORTÂNCIA DA COLETA E DO TRANSPORTE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	19
<hr/>	
COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA O LABORATÓRIO	20
<hr/>	
MEIOS DE CULTURA PARA TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO	21
<hr/>	
Cary & Blair	21
Cary & Blair modificado	21
Água peptonada alcalina com tioglicolato e cistina	21
Meio Stuart	21
Meio de Amies – meio Stuart modificado	21
Salina glicerinada e tamponada	22
Coleta em papel filtro	22
COLETA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS	23
<hr/>	
Fezes	23
Fezes de emissão espontânea – in natura	23
Swab retal	23
Swab fecal	23
EXAME DIRETO DE FEZES: AVALIAÇÃO PRESUNTIVA	24
<hr/>	
Observações	24
Sangue	25
Principais cuidados para coleta	25
Volume para cultura	25

TRANSPORTE	26
Uso da PCR para diagnóstico bacteriano	26
Cuidados na coleta e na manutenção da amostra para diagnóstico por PCR	27
MECHA – SWAB DE MOORE	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS – AGENTES ETIOLÓGICOS (ENTEROBACTÉRIAS) DAS DTA E DDA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E COLETA DE MATERIAL	31
Anexo A – Coleta e remessa de amostras clínicas para diagnóstico (coprocultura) de enterobactérias e <i>Vibrio cholerae</i>	32
Anexo B – Coleta, preservação e transporte de amostras clínicas extraintestinais para o diagnóstico de <i>Salmonella Typhi</i> e <i>Salmonella Paratyphi</i>	33
Anexo C – Coleta, preservação e transporte de amostras clínicas extraintestinais para o diagnóstico de enteropatógenos bacterianos	34
Anexo D – Coleta, preservação e transporte de amostras ambientais	35

INTRODUÇÃO



O perfil epidemiológico das Doenças de Transmissão Alimentar (DTA) e Doenças Diarreicas Agudas (DDA) vem sofrendo mudanças, tendo em vista, principalmente, o surgimento de novos patógenos denominados emergentes, os quais podem provocar graves manifestações clínicas, óbitos e sequelas resultantes de seu potencial patogênico. De modo geral, caracteriza-se por uma síndrome de anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, muitas vezes não acompanhada de febre. Os sintomas digestivos, dependendo do agente causal, não são as únicas manifestações dessas doenças. Podem ser ocasionadas por uma variedade de organismos bacterianos, virais e parasitários. A diarreia ocorre em todo o mundo com características amplas e distribuições sazonais, podendo determinar infecções extraintestinais que afetam diferentes órgãos e sistemas, tais como o geniturinário e periférico, fígado, articulações, sistema nervoso central etc. A disseminação e a prevalência de doenças diarreicas estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento regional, social e econômico, juntamente aos hábitos de vida. A identificação precisa de agentes etiológicos diarreicos não só resulta em melhores regimes de tratamento, mas também desempenha papel importante na análise de fatores de risco associados à sua prevalência. A identificação dos patógenos também facilita a localização da fonte, a melhoria no processamento de alimentos e o gerenciamento da oferta e da promoção da segurança alimentar.

Mais especificamente, os termos DTA e DDA envolvem uma multiplicidade de agentes causais, destacando-se os de origem bacteriana como mais frequentes. Entre eles, a maioria é encontrada na família Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EagEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* aderente invasiva (AIEC), *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC), *Shigella* sp., *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica*; família Vibrionaceae (*V. cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* etc.); família Aeromonadaceae (*Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* etc.); gênero *Campylobacter*, com as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, sendo a primeira responsável por 90% das infecções, e a espécie *Listeria monocytogenes*. Além desses gêneros/espécies, outros patógenos assumem relevância nos processos intestinais em menor casuística, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

Existem vários mecanismos patogênicos envolvidos com a determinação das DTA e DDA por agentes bacterianos, os quais podem ser agrupados em duas categorias, as infecções e as intoxicações.

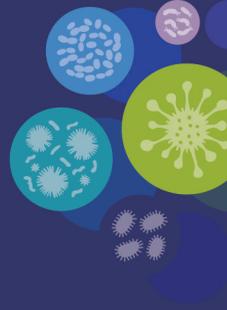
As infecções alimentares são ocasionadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos. Estes aderem à mucosa do intestino humano e proliferam, colonizando-o. Em seguida, pode ocorrer a invasão da mucosa e a penetração nos tecidos, bem como a disseminação para outros órgãos (bactérias invasivas), ou ainda a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrointestinal (bactérias toxigênicas). Esses processos infecciosos geralmente são exclusivos, ou seja, apenas um deles prevalece.

Entre as bactérias invasivas, destacam-se a *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteroinvasiva e aderente invasiva, *Yersinia enterocolítica*, entre outras. Geralmente são associados a diarreias frequentes, mas não volumosas, contendo sangue e pus, dores abdominais intensas, febre e desidratação leve, sugerindo infecção do intestino grosso por bactérias invasivas. A microscopia das fezes revela numerosos piócitos e leucócitos. Há também registros de síndromes pós-infecção reconhecidas como importantes sequelas de DTA, como a síndrome hemolítica urêmica, após infecção por *E. coli* O157:H7, síndrome de Reiter após salmonelose, shigelose e yersiniose (*Y. enterocolítica*), síndrome de Guillain-Barré após campilobacteriose e abortamento ou meningite em pacientes com listeriose.

Já no segundo tipo (bactérias toxigênicas), o quadro clínico é determinado por toxinas liberadas pelos microrganismos, quando estes se multiplicam na luz intestinal. Essas toxinas atuam nos mecanismos de secreção/absorção da mucosa do intestino. As infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae* O1 e O139, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* são exemplos clássicos. Normalmente, a diarreia, nesses casos, é intensa, sem sangue ou leucócitos, febre discreta ou ausente, sendo comum a desidratação.

Acrescenta-se ainda a ingestão de toxinas formadas em decorrência da intensa proliferação do microrganismo patogênico no alimento, tendo como consequência a ocorrência de diarreia e vômitos. Exemplos desse processo são as intoxicações causadas por *Staphylococcus aureus*. Consumo de alimentos contaminados pelo *Bacillus cereus* pode provocar duas síndromes: a emética (vômito) e a diarreica. *Clostridium botulinum* que produz uma potente neurotoxina cujo principal modo de transmissão é através da ingestão de uma toxina pré-formada presente em alimentos malconservados.

ASPECTOS CLÍNICOS DOS PATÓGENOS PREVALENTES NAS DDA E DTA



Família Staphylococcaceae

Staphylococcus aureus

O gênero *Staphylococcus* é anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, e pode crescer 10% NaCl. Está presente na pele e na microbiota nasal, causando infecções oportunistas em seres humanos e em vários animais. Colonizam as mucosas, especialmente de mamíferos e aves, nas quais eventualmente podem ocasionar um processo infeccioso em decorrência de alterações teciduais do hospedeiro, como traumas. Infecções estafilocócicas estão entre as doenças oportunistas mais comuns, razão pela qual as atenções devem ser redobradas no controle desse patógeno

De acordo com o *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature* (PARTE, 2018), existem 52 espécies e 28 subespécies descritas pertencentes a esse gênero, habitando diferentes ambientes e espécies animais. O gênero é subdividido em dois grupos, com base na produção da enzima coagulase, cuja função é formar coágulos de fibrina no tecido do hospedeiro, dificultando seu reconhecimento e a fagocitose por parte do sistema fagocitário mononuclear.

A intoxicação alimentar por estafilococos é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos por cepas enterotoxigênicas de *S. aureus*. A ocorrência de surtos de intoxicação alimentar é registrada em todo o mundo. Leite cru, pasteurizado, leite UHT e derivados lácteos, como queijo frescal, creme de leite, chantilly, são os alimentos mais envolvidos com intoxicação alimentar estafilocócica; no entanto os produtos de confeitaria, tortas recheadas com creme, saladas de batata, creme de ovos etc., atum, frango e derivados cárneos como presunto podem ser veículos do microrganismo e de suas enterotoxinas. A manutenção do alimento contaminado em temperatura ambiente leva à reprodução de *Staphylococcus aureus* e à consequente produção da toxina, a qual não é destruída pelo cozimento. Uma vez formada no alimento, este pode ocasionar a intoxicação mesmo após o processamento e a destruição do microrganismo. As principais falhas incluem higiene no manuseio e aquelas associadas com temperatura de armazenagem.

A intoxicação estafilocócica se caracteriza basicamente por vômitos intensos que se iniciam em torno de 2 a 4 horas após a ingestão de alimentos contaminados com a toxina, podendo se prolongar por até 48 horas. Os principais sintomas associados são náuseas, vômito, sudorese intensa, diarreia, cólicas, cefaleia e, por vezes, ocorre hipotermia. Em geral, o paciente se recupera bem e raramente o caso é fatal, mas a intoxicação pode apresentar mais consequências em crianças, imunossuprimidos e idosos, os quais representam a população mais suscetível.

Várias cepas *S. aureus* são produtoras das enterotoxinas estafilocócicas (EE) em alimentos. Cinco EE clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são as causas mais comuns de DTA por *S. aureus*. Além disso, 16 novos tipos de EE ou superantígenos (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU e SEV) também foram descritos e avaliados. As EE mais comuns são SEA e SEB. A SEA é mais frequentemente envolvida na intoxicação alimentar. A SEB não está apenas envolvida na intoxicação alimentar, mas identificada como uma virtual arma de guerra biológica.

Família Vibrionaceae

Gênero *Vibrio*

São bastonetes Gram-negativos, metabolismo aeróbio facultativo, sendo reconhecidas acima de 175 espécies e possivelmente um número maior de subespécies, 12 das quais estão envolvidas em processos de agressão ao homem, determinando infecções no trato entérico ou ainda extraintestinal; 8 das quais podem estar associadas a infecções de origem alimentar; e 14 em processos de agressão a diferentes espécies animais aquáticas.

O comprometimento humano por espécies de *Vibrio* está geralmente dividido em três principais síndromes clínicas: gastroenterite, septicemia primária e infecção cutânea, envolvendo uma série de interações ecológicas em que o contato com o ambiente aquático e o consumo de pescado, especialmente in natura ou após cocção insuficiente, constituem os principais veículos de transmissão. A maioria das infecções de origem alimentar é ocasionada por *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* não O1 não O139, seguidas de *V. vulnificus* e, em menor extensão, *V. fluvialis* e *V. mimicus*. Esse risco aumenta se o alimento for manuseado incorretamente durante o processamento, no qual os patógenos podem se multiplicar exponencialmente em condições favoráveis. Em contraste com a maioria dos outros patógenos de origem alimentar, *Vibrio* spp. tem o habitat aquático como nicho natural.

V. cholerae não O1 não O139 pode ocasionalmente causar sintomas similares àqueles por *V. cholerae* O1. *V. vulnificus* pode estar envolvido com gastroenterite, infecção cutânea ou septicemia; essa última, especialmente em pessoas com doença hepática ou imunossuprimidos, pode ocorrer subsequentemente à ingestão do microrganismo ou à penetração através da pele.

Excetuando-se as relações entre pilus de toxina-TCP e toxina colérica com *V. cholerae* O1 e a hemolisina termoestável produzida por *V. parahaemolyticus*, o mecanismo de patogenicidade das diferentes espécies do gênero *Vibrio* não se encontra totalmente esclarecido.

A realização de diferentes estudos vem permitindo verificar que são capazes de produzir diferentes toxinas (NAG-ST, toxina semelhante à produzida por *S. dysenteriae* 1, *Zonula Occludens* etc.) e enzimas (DNase, elastase, hemolisina etc.), as quais estão envolvidas, direta ou indiretamente, na sua capacidade de agressão ao homem.

V. cholerae

Atualmente, são reconhecidos 250 sorogrupos de *V. cholerae*, os quais são capazes de ocasionar infecção entérica, alguns capazes de produzir uma síndrome coleriforme, excepcionalmente com características epidêmicas. Entre eles, dois sorogrupos têm características epidêmicas ou pandêmicas, *V. cholerae* O1 e o sorogrupo O139, que determinam doença infecciosa intestinal aguda e muitas vezes letal exclusiva dos seres humanos, sendo de veiculação predominantemente hídrica.

Representa um sério problema de saúde pública, particularmente em países que apresentam precariedade de saneamento e ausência ou redução de disponibilidade de água potável. É uma infecção extremamente grave, que pode ocasionar diarreia aquosa e profusa resultando em quadro de desidratação grave. O período de incubação com o aparecimento dos sintomas varia de 12 horas a 5 dias após o consumo da água ou de alimentos contaminados. A maioria das pessoas infectadas não desenvolve sintomas típicos, embora o microrganismo esteja presente nas fezes por um a dez dias após a infecção. Por meio das fezes desses indivíduos, os microrganismos têm acesso ao ambiente aquático, que representa a principal fonte de disseminação.

A patogênese da cólera é um processo multifatorial envolvendo genes que codificam diferentes proteínas que atuam na colonização (pilus de toxina-TCP) e na ação da toxina-CT.

Esta resulta no aumento de AMP-cíclico, conseqüentemente, com diarreia hiper secretória, com grande perda de líquidos e eletrólitos, com inúmeras dejeções diárias, vômitos ocasionais, câimbras musculares, desidratação, acidose e colapso circulatório. Pode levar rapidamente à desidratação grave e à morte se o tratamento não for prestado prontamente.

Na atualidade, acredita-se que sua sazonalidade em áreas endêmicas está associada à temperatura, salinidade e interação com determinadas espécies de hospedeiros. A temperatura da água tem sua faixa mais favorável situada entre 10°C e 32°C. Embora o *V. cholerae* seja encontrado em rios e áreas de estuários, cepas de *V. cholerae* não O1 não O139 são mais comumente isoladas do ambiente do que dos sorogrupos O1 e O139.

V. parahaemolyticus

A gastroenterite associada com esse microrganismo se caracteriza por diarreia líquida, cólica abdominal, náusea, vômitos, dor de cabeça, febre e calafrios. Nos casos mais severos, em vez de diarreia ocorre disenteria com fezes mucoides e sanguinolentas. Além disso, esse microrganismo pode causar infecções extraintestinais, tendo sido isolado de lesões cutâneas, dos olhos, ouvidos e corrente circulatória. O período de incubação varia de 12 a 24 horas após a ingestão de alimentos, porém pode se situar entre 30 horas, e a duração da doença de 2 a 7 dias.

Os mecanismos dessa patologia ainda não estão completamente elucidados, sugerindo uma forte associação das hemolisinas *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH) e *Thermostable Related Hemolysin* (TRH) com a doença, ou seja, são importantes fatores de virulência de *V. parahaemolyticus*. A dose para causar a infecção é geralmente superior a 10⁶ organismos, podendo ser inferior quando se faz uso de antiácidos.

Entre os alimentos envolvidos, destaca-se o pescado, consumido sem ou com cozimento insuficiente.

V. vulnificus

O reservatório primário de *V. vulnificus* é água do mar, e indivíduos acometidos pela infecção relatam o contato ou a ingestão de alimentos marinhos sem cozimento, principalmente ostras.

É um dos patógenos que apresenta maior poder de invasibilidade, com duas vias de entrada no organismo humano. Uma delas é mediante ingestão de alimentos marinhos, sendo as ostras a principal fonte de veiculação nos casos de septicemia primária, com alta taxa de mortalidade. A segunda via de entrada é através de lesões presentes na epiderme. Contrariamente à septicemia primária, as infecções das feridas apresentam baixa taxa de mortalidade, relatando-se casos de amputação de membros afetados.

Clinicamente pode se manifestar por uma septicemia primária, resultante da ingestão de alimentos de origem marinha contaminados. A morte ocorre rapidamente em 50% dos casos e em 25% dos casos de invasão cutânea. Os sintomas iniciais incluem febre, mal-estar, calafrios, sobrevivendo à septicemia em 36 horas. Nesse caso, a diarreia é rara. Constituem-se grupos de risco para essa forma da doença os indivíduos com função hepática prejudicada e os indivíduos portadores de imunossupressão.

Na outra forma da doença a infecção é cutânea, os sintomas podem aparecer dentro de quatro horas pós-infecção e caracterizam-se por dor intensa, eritema e edema no local que rapidamente evolui para lesões necrosadas envolvendo o tecido subcutâneo, acompanhada por toxemia severa.

Um quadro gastroentérico em pessoas sadias, caracterizando-se por vômitos, diarreia e dor abdominal, vêm sendo notificado, ocorrendo entre 12 horas a 3 dias após o consumo de alimento contaminado.

Ordem Enterobacterales

Família Enterobacteriaceae

Gênero *Salmonella*

Salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais prevalentes, considerada uma zoonose complexa e cosmopolita que afeta a saúde pública mundial. *Salmonella* spp. é reconhecida como causa primária de inúmeros surtos de origem alimentar no mundo.

A constituição genética dessa bactéria permite a adaptação desta a uma variedade de ambientes e diferentes espécies animais, tanto de sangue quente quanto frio. O trato intestinal de uma ampla variedade de animais é fonte de infecção de *Salmonella* spp., a qual ainda pode sobreviver em ambientes diversos, o que explica seu elevado potencial de disseminação. As aves se destacam como reservatórios dessa bactéria, assim a carne de frango e seus derivados estão entre os produtos de origem animal mais incriminados na transmissão de *Salmonella* spp. ao homem.

A maioria dos sorovares de *Salmonella* spp. não são espécie-específicas, podendo acometer uma gama significativa de diferentes hospedeiros. No entanto, alguns poucos sorotipos apresentam predileção por um determinado hospedeiro, as chamadas cepas espécie-específicas. A especificidade de alguns sorovares por determinados hospedeiros ocorre devido às contínuas mutações e seleções naturais, levando a um quadro infeccioso potencialmente crítico em um hospedeiro específico. Como sorovares espécie-específicos podemos citar *S. Typhi* e *S. Paratyphi A*, que acometem os humanos; *S. Abortusovis*, os ovinos; *S. Abortusequi*, os equinos; *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, as aves; *S. Dublin*, os bovinos; e *S. Choleraesuis*, os suínos.

Entre os inúmeros sorovares zoonóticos de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis* são os mais comumente identificados em casos humanos de veiculação por alimentos, assim como são os sorovares prevalentes nas aves vivas e na carne de frango.

O quadro clínico pode variar de acordo com o hospedeiro, porém, na maioria das vezes, o indivíduo infectado apresenta diarreia, febre, náuseas às vezes acompanhadas de vômitos e cólicas abdominais. O início dos sintomas ocorre entre 6 e 72 horas, com média entre 12 e 36 horas após a infecção, podendo durar de 2 a 7 dias. Os sintomas da salmonelose são, em grande parte, leves e autolimitados, sem necessidade de tratamento específico. No entanto, em alguns

casos, a diarreia pode se agravar, levando à desidratação, e, por vezes, a infecção se propaga do intestino para a corrente sanguínea, como uma bacteremia e/ou septicemia, com elevado risco de óbito. Embora seja em menor frequência, alguns indivíduos infectados desenvolvem dor nas articulações, conhecida como artrite reativa, que pode durar meses ou anos, podendo evoluir à artrite crônica. Para a prevenção da doença, são necessárias medidas de controle em todas as etapas da produção de alimentos, tais como produção agrícola ou ambiente de criação de animais de produção, processamento do alimento na indústria, preparação nos estabelecimentos comerciais e também nas residências e cozinhas industriais. O manuseio seguro da carne crua, o bom cozimento e a boa higiene na cozinha podem prevenir ou reduzir o risco representado pelos alimentos contaminados. É importante enfatizar, nesse ciclo, a figura de portador de *Salmonella* spp. no manuseio de alimentos em indústrias, escolas, creches, restaurantes e domicílio.

Gênero *Shigella*

São conhecidas quatro espécies ou sorogrupos de *Shigella*: *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, distribuídos em diferentes sorotipos: sorogrupo A: *Shigella dysenteriae* (12 sorotipos); sorogrupo B: *Shigella flexneri* (6 sorotipos); sorogrupo C: *Shigella boydii* (23 sorotipos); sorogrupo D: *Shigella sonnei* (1 sorotipo). A incidência da infecção é relatada como sendo de 188 milhões de casos/ano, com \pm 1 milhão de mortes/ano. Em países desenvolvidos, a incidência chega a ser de 1,5 milhão de casos por ano.

Ocorre normalmente em locais com precárias condições de higiene e problemas de saneamento básico; endêmica em países subdesenvolvidos e emergentes e de clima tropical, especialmente as espécies *S. flexneri* e *S. dysenteriae*. Quase todas as espécies podem produzir doença grave, com exceção de *S. sonnei*, que é relativamente mais leve e limitante.

As principais características clínicas incluem cólicas abdominais, diarreia por vezes com sangue, pus ou muco, febre, vômitos e tenesmo. Em alguns casos, a diarreia pode ser líquida, durando em torno de quatro a sete dias. No caso de *S. dysenteriae*, as manifestações clínicas podem progredir com um processo de ulceração com diarreia sanguinolenta e elevada concentração de neutrófilos nas fezes. A produção da “toxina de Shiga” pelo patógeno representa um importante papel em sua patogênese. *Shigella* spp. parece melhor adaptada para determinar doença no homem que a maioria das outras bactérias entéricas. O período de incubação é em média de um a três dias, e de aproximadamente uma semana para a *S. dysenteriae*, e a ingestão de 10 a 100 células pode determinar a infecção, dose infectante menor que as de outras bactérias entéricas. Nos casos de surto de shigelose, a figura do portador momentâneo (mãos, unhas, leito ungueal), nas tarefas de convivência com idosos (asilos) e crianças (creches) e nas tarefas que envolvem alimentos, requer atenção por representar risco de disseminação.

Gênero *Escherichia*

É um bacilo Gram-negativo, utilizado como indicador de contaminação fecal em alimento, por pertencer à microbiota normal do trato entérico. Constitui um grupo de bactérias geneticamente heterogêneo e em contínua evolução. A maioria das cepas é comensal, entretanto algumas têm sido implicadas em ampla gama de doenças que afetam seres humanos e animais em âmbito mundial. O mecanismo de patogenicidade de *E. coli* é multifatorial, envolvendo grande número de fatores de virulência que variam conforme o patótipo. Eles incluem funções de adesão, fatores que modificam a superfície da célula hospedeira, invasivas e toxinas, bem como sistemas de secreção que exportam toxinas e outros fatores de virulência.

São agrupadas com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas, em oito classes: *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência-difusa (DAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* aderente invasiva (AIEC), que tem sido associada com doença de Crohn, e *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC), que carrega genes associados à virulência de STEC e EAEC (uma EAEC que adquiriu o fago que transporta o gene que codifica para a toxina Shiga de STEC), das quais EaggEC e DAEC não são efetivamente reconhecidas por sua transmissão a partir de alimentos. Determinados sorotipos de *E. coli* são frequentemente associados com patótipos específicos, tais como O157: H7 e O103: H21, que são importantes STEC, muitas vezes referidos como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) por expressarem, além dos genes para toxina Shiga, outro gene, para uma intimina encontrada na ilha de patogenicidade LEE de EPEC; e o sorotipo O104: H4 (EAHEC que causou um surto na Europa em 2011, com dezenas de mortes).

EPEC – *E. coli* enteropatogênica clássica

Importante microrganismo causador de gastroenterite em crianças usualmente em reduzida faixa etária (≤ 5 anos), sendo recém-natos e lactentes jovens também mais susceptíveis à infecção por EPEC. O mecanismo patogênico envolve adesão à membrana plasmática dos enterócitos, causando destruição do microvilosidades adjacentes. A diarreia resulta da perda das propriedades absorptivas das células infectadas, caracterizando-se pela presença de muco abundante, sem sangue, acompanhada de dores abdominais, febre, vômitos e desidratação, sendo reconhecida inclusive por causar diarreia crônica. A duração da doença varia de 6 horas a 3 dias (média de 24 horas), com período de incubação variando entre 12 e 36 horas. Adultos geralmente não manifestam a doença, sendo portadores assintomáticos.

EIEC – *E. coli* enteroinvasiva

Ocorrem com maior frequência nos países subdesenvolvidos, atingindo adultos e crianças de maior faixa etária, estando envolvidas em surtos de infecção alimentar nos países industrializados. A maioria das cepas de EIEC apresenta diversas características bioquímicas que as tornam diferentes das demais, mas semelhantes à *Shigella*. Entre essas características especiais estão: incapacidade de descarboxilação da lisina, ausência ou fermentação tardia da lactose e ausência de flagelos.

As EIEC são capazes de invadir o epitélio, semelhantes à patologia determinada por *Shigella*. Os sintomas característicos da doença são disenteria, cólica abdominal, febre e mal-estar geral, com eliminação de sangue, muco e polímeros nucleares nas fezes. O período de incubação varia entre 10 e 18 horas após a ingestão do alimento contaminado. A disenteria causada por essa bactéria é normalmente autolimitada sem complicações. Contudo uma seqüela comum associada a essa infecção, especialmente em crianças, é a síndrome hemolítica urêmica (SHU). Estudos realizados com voluntários adultos indicam que a dose de infecção é alta (10^6 a 10^8 células/mL), e mais raramente com concentrações mais reduzidas (10 células/mL).

ETEC – *E. coli* enterotoxigênica

A infecção por ETEC caracteriza-se por adesão aos enterócitos do intestino delgado e produção de enterotoxina termo lábil (LT), semelhante à toxina colérica e/ou enterotoxina termoestável (ST), determinando uma diarreia hiper secretória. Leva a um quadro de desidratação grave em crianças nos primeiros anos de vida, sendo também uma importante causa da diarreia em viajantes. Nesse caso, o quadro clínico se manifesta por fezes líquidas, dor abdominal, febre baixa, náusea e mal-estar. A infecção é usualmente autolimitada, durando não mais que cinco dias, exigindo, contudo, em crianças e idosos debilitados, reposição hidroeletrólítica.

O período de incubação varia de 10 a 12 horas, observado em surtos e estudos realizados em voluntários com cepas produtoras de LT e ST. Esse período pode se estender por até 24 a 72 horas de incubação em outros grupos de voluntários. A dose de infecção também é alta (10^6 a 10^8 células/mL).

STEC – *E. coli* produtora da Shiga-toxina

É um dos patótipos mais importantes para a saúde pública, uma vez que ela está vinculada a doenças transmitidas por alimentos, principalmente produtos cárneos de origem bovina, sendo capaz de colonizar o epitélio intestinal. Quando implicadas em casos de colite hemorrágica, são comumente referidas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Tem como principal representante o sorotipo O157:H7, o protótipo do grupo, por ser o mais frequente em casos de doença de transmissão alimentar. O mecanismo como *E. coli* O157:H7, que ataca o epitélio do intestino, é muito parecido com aquele observado em cepas enteropatogênicas, incluindo aderência às células epiteliais, com destruição das microvilosidades adjacentes e produção de citotoxina. São duas as citotoxinas produzidas por *E. coli* O157:H7: *Shiga-like*, toxina do tipo I (SLTI), e *Shiga-like*, toxina do tipo II (SLTII). Elas são assim chamadas por serem similares à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I. Essas toxinas também são conhecidas pelo nome de verotoxinas, por possuírem efeito citotóxico em células Vero.

Um aspecto peculiar da *E. coli* O157:H7 é a capacidade de produzir amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (HUS) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). As manifestações sistêmicas na HUS e PTT podem ser fatais, como corolário da isquemia vascular, secundária à formação de trombos localizados nos rins, no caso de HUS, e disseminados, no caso de PTT.

A colite hemorrágica é caracterizada clinicamente por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta, diferindo das manifestações clínicas causadas por outros agentes invasores, pela grande quantidade de sangue nas fezes e por ausência de febre. O período de incubação varia de três a oito dias. A duração da doença varia de dois a nove dias. A enterocolite pode evoluir para a forma grave chamada síndrome hemolítica urêmica (HUS).

Embora a *E. coli* O157:H7 seja a mais estudada, cepas de *E. coli* pertencentes a diversos outros sorotipos já foram descritas como produtoras de citotoxinas.

EaggEC – *E. coli* enteroagregativa

A *E. coli* enteroagregativa tem sido implicada como causa de diarreia aquosa persistente, de duração superior a 14 dias, em crianças de 6 meses a 3 anos de idade, nos países emergentes. Seu mecanismo patogênico envolve adesão aos enterócitos, produção de enterotoxina termoestável e de hemolisina termo lábil. A ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada. A secreção excessiva de muco induz a formação de biofilme, principalmente na região do cólon. Uma vez estabelecido o biofilme, pode ocorrer a liberação de toxinas bacterianas, que destroem o epitélio intestinal, resultando na ocorrência de diarreia com presença de muco.

DAEC – *E. coli* aderência difusa

Descrita em crianças com diarreia, porém seu real papel na síndrome diarreica não está ainda definido. Não foi demonstrada a produção de toxinas, mas têm sido identificados fatores de adesão relacionados àqueles presentes em cepas responsáveis por infecções urinárias, tais como proteína de membrana (AIDA), fímbria F1845 e adesinas afimbriais (AFA-I e AFA-III).

As adesinas são consideradas fator de virulência para esse patotipo. A adesão resulta em alteração das microvilosidades, das proteínas do citoesqueleto, e em consequente aumento da permeabilidade dos enterócitos, contribuindo para a ocorrência de diarreia.

AIEC – *E. coli* aderente-invasiva

AIEC são consideradas patobiontes e têm sido isoladas em mucosa intestinal de indivíduos apresentando doença de Crohn. Esse patotipo de *E. coli* é capaz de aderir e invadir o epitélio intestinal e sobreviver no interior de macrófagos, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios como TNF. Podem ser detectadas em todo o trato gastrointestinal.

EAHEC – *E. coli* enteroagregativa-hemorrágica

Em 2011 houve um surto de doença gastrointestinal, iniciado na Alemanha, e que se estendeu por vários países da Europa, acometendo milhares de pessoas com quadro de gastroenterite aguda, colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemorrágica, resultando em mais de 50 óbitos. Foi isolada uma cepa de STEC do sorotipo O104:H4, multirresistente. A análise molecular revelou uma combinação de dois patotipos diferentes de *E. coli*: a produção de toxina Shiga, característica de STEC; e a presença de um plasmídeo codificando fimbrias de aderência agregativa (AAF), característica de EaggEC. Além disso, a cepa era produtora de betalactamases de espectro estendido. A associação desses fatores favoreceu o potencial de virulência aumentado das cepas.

Gênero *Yersinia*

Yersinia enterocolitica

Os sintomas das yersinioses (*Y. enterocolitica*) variam dependendo da idade da pessoa infectada. Em crianças, os sintomas comuns são febre, dor abdominal e diarreia, geralmente sanguinolenta. Nos adultos, os sintomas são febre, dor abdominal (simulando quadro de apendicite) e diarreia (pode ser sanguinolenta e persistir por várias semanas). Os sintomas ocorrem geralmente de quatro a sete dias após a exposição, e podem durar de uma a três semanas ou mais. Enterocolite necrosante tem sido descrita em lactentes. As complicações são raras e podem incluir erupções cutâneas, artrite reativa, afetando punhos, joelhos e tornozelos, geralmente um mês após a infecção diarreica, resolvendo-se após um a seis meses. O eritema nodoso também pode ocorrer, manifestando-se como lesões dolorosas, avermelhadas, vermelhas ou púrpuras ao longo do tronco e das pernas, geralmente se resolvendo espontaneamente dentro de um mês.

Y. enterocolitica é uma bactéria psicotrófica, e alimentos refrigerados de origem animal tornam-se importantes fatores de risco para o consumidor. Tem sido isolada de diversos alimentos em diferentes países, inclusive no Brasil, sendo os produtos crus ou malcozidos de porco, leite e subprodutos, bem como a água não tratada de maior casuística, podendo ainda ser transmitida pelo contato direto ou indireto com animais. Apesar de ser uma bactéria amplamente distribuída na natureza, apenas alguns sorotipos são patogênicos para o homem e prevalentes em suínos. São eles: O3; O5,27; O8; e O9, sendo o *Y. enterocolitica* O3, fagotipo VIII, o mais comum no Brasil.

Suínos são considerados a principal fonte de sorotipos patogênicos de *Y. enterocolitica* para o homem, uma vez que o intestino e as tonsilas de recém-nascidos são facilmente colonizados, tornando-os portadores temporários e/ou permanentes.

A patogenicidade de *Y. enterocolitica* ocorre mediante invasão da mucosa intestinal ao nível da região ileocecal, produzindo enterite, ileíte terminal e linfadenite mesentérica. No caso de enterite, infecções extraintestinais por *Y. enterocolitica* podem ocorrer, entre elas, septicemia, artrite, síndrome de Reiter, eritema nodoso, endocardite e glomerulonefrite. O período de incubação é de três a sete dias.

Família Campylobacteraceae

Gênero *Campylobacter*

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* spp. são hospedeiros naturais do intestino de grande variedade de animais, principalmente aves, apontadas como principal fonte de infecção e transmissão da bactéria para a espécie humana. A incidência e a prevalência da campylobacteriose têm aumentado de forma significativa, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento.

O homem pode ser infectado por esse microrganismo de forma direta, por meio do contato do ser humano com animais ou carcaças contaminadas, ou de forma indireta, com a ingestão de alimentos contaminados. No entanto, a maioria das infecções por *Campylobacter* spp. está associada à ingestão desse agente em alimentos contaminados, tais como carnes cruas ou malcozidas, aves, suínos e bovinos, leite não pasteurizado e água. Porém, a carne de aves é a mais incriminada nos casos de campylobacteriose.

Entre os representantes do gênero, as espécies termotolerantes são capazes de infectar o homem, causando gastroenterite, principalmente via consumo de alimentos contaminados. As espécies mais envolvidas na doença humana são *C. jejuni* e *C. coli*. A tolerância a baixas temperaturas em espécies de *Campylobacter* spp. é cepa-dependente. Além disso, a manutenção desses microrganismos sob essas condições extremas favorece a formação de células viáveis não cultiváveis (VNC) que reduzem o processo de transcrição de características de virulência. Porém, o retorno ao estado cultivável pode ser reestabelecido através da passagem por um hospedeiro.

A baixa dose infectante de *Campylobacter* spp. (cerca de 400 a 500 células) pode contribuir para sua elevada prevalência. As infecções humanas por *Campylobacter* spp. geralmente se desenvolvem a partir de um a cinco dias após o contato com o agente, sendo caracterizada por diarreias que às vezes podem ser sanguinolentas, com dores abdominais, febre e vômitos, com duração entre cinco a sete dias, ocorrendo principalmente em crianças, idosos e imunodeprimidos.

Doenças graves como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) podem estar relacionadas com a infecção pelo patógeno. Essa síndrome é uma doença autoimune, que provoca paralisia flácida generalizada, podendo acometer anualmente até 4 pessoas para cada 100 mil habitantes, sendo a infecção por *Campylobacter jejuni* a mais frequente. A síndrome possui uma variante conhecida como síndrome de Miller-Fisher, sendo caracterizada por ataxia, arreflexia e oftalmoplegia. Outra síndrome decorrente da infecção por *Campylobacter jejuni* é a síndrome de Reiter, ou artrite reativa, que é uma resposta autoimune, provocando inflamações em diversas articulações.

Família Aeromonadaceae

Gênero *Aeromonas*

Bactérias do gênero *Aeromonas* ocorrem de maneira ubíqua e autóctone em ambientes aquáticos. As espécies de *Aeromonas* causam amplo espectro de síndromes de doenças entre animais de sangue quente e frio, incluindo peixes, répteis, anfíbios, mamíferos e humanos. O gênero pode ser dividido em dois grandes grupos. Espécies mesófilas móveis, incluindo aquelas que podem causar doenças em humanos; e espécies imóveis, psicrófilas, que geralmente ocasionam doenças em peixes.

Esses microrganismos têm sido reportados como importantes agentes de infecções oportunistas no homem, de modo particular em crianças e indivíduos imunocomprometidos, bem como patógenos em infecções locais e sistêmicas em indivíduos saudáveis.

No amplo espectro das patologias, incluem-se celulites, meningites, bacteremia, peritonites, infecções broncopulmonares e, mais frequentemente, infecções gastrointestinais. Estudos e observações clínicas trazem evidências sobre o papel de *Aeromonas* sp. como um patógeno gastrointestinal. As taxas do isolamento em fezes de indivíduos com diarreia variam de 1% a 60% dos casos. As espécies *A. dhakensis*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* e *A. schubertii* constituem a grande maioria, entre 90% a 95%, de todos os isolados clínicos envolvidos com infecções gastroentérica e extraintestinais.

A sintomatologia das gastroenterites associadas à *Aeromonas* spp. tende à cronicidade em adultos, sendo aguda e mais severa em crianças. A diarreia por *Aeromonas* spp. pode ser classificada em:

- ▶ Diarreia aguda e secretória, muitas vezes acompanhada de vômito, cujas fezes apresentam aspecto de "água de arroz", com intensa perda de líquidos e sais minerais, que pode evoluir para um quadro de choque hipovolêmico.
- ▶ Diarreia aguda e disentérica com sangue e muco nas fezes.
- ▶ Diarreia crônica, com duração superior a dez dias, ocasionando perda de peso e desidratação profunda.
- ▶ Diarreia do viajante.

Em pacientes idosos, podem ser observados quadros de enterocolites seguidos de vômito, febre e presença de leucócitos nas fezes. O período de incubação é variável, de horas a dias, com duração variável e prolongada em imunodeprimidos.

As manifestações clínicas são variadas de acordo com o estado imunológico do indivíduo acometido e dos fatores de virulência do microrganismo. Os possíveis fatores de virulência das espécies de *Aeromonas* incluem toxinas (citotóxicas e citotônicas), proteases, hemolisinas, lipases, adesinas, aglutininas, pili, enterotoxinas, várias enzimas e matrizes de membrana externa, como uma camada S e uma cápsula, enolase, e a presença de um Sistema de Secreção do Tipo VI.

Ordem Enterobacterales

Plesiomonas shigelloides

Inicialmente, *Plesiomonas shigelloides* recebia pouca ou nenhuma atenção devido ao seu isolamento pouco frequente em espécimes clínicos e à sua associação singular com episódios esporádicos associados ao trato gastrointestinal. Contudo, ao longo das últimas décadas, *P. shigelloides* veio à luz como potencial patógeno causador de gastroenterite bacteriana em humanos.

Plesiomonas podem ser isoladas a partir de vários substratos e têm como reservatório natural os ecossistemas aquáticos, incluindo fontes de água doce e salobras ou estuarinas, além de relatos de seu isolamento a partir de esgotos e, mais raramente, de águas dos mares, podendo ainda fazer parte da microbiota normal de animais aquáticos ectotérmicos.

Sob o aspecto clínico, *Plesiomonas shigelloides* é capaz de causar variadas síndromes, que podem ser divididas nos seguintes grupos: (i) infecções gastrointestinais e/ou complicações envolvendo o intestino delgado ou grosso; (ii) doença sistêmica com septicemia associada ou não a complicações do sistema nervoso central, como meningite; e (iii) infecções diversas, incluindo doença intra-abdominal, infecções de tecidos moles e feridas e doenças oculares.

A gastroenterite normalmente determina doença autolimitada, moderada, apresentando febre, calafrios, dor abdominal, náusea, vômito e diarreia – esta é geralmente líquida, sem muco e sangue; em casos severos, as fezes tem a tonalidade amarelo-esverdeada com traços de sangue. A duração da doença em pessoas saudáveis pode ser de um a sete dias. Pode se tornar um quadro de disenteria persistente e colite pseudomembranosa, seguida de dor abdominal, febre, náuseas, vômitos e desidratação, principalmente em pacientes imunocomprometidos, que podem evoluir para septicemia e morte. Os sintomas podem se iniciar de 20 a 24 horas após o consumo de alimentos e/ou água contaminados, com duração de 1 a 7 dias.

Família Listeriaceae

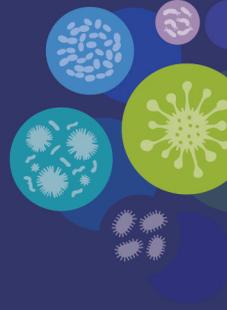
Listeria monocytogenes

Atualmente, o gênero *Listeria* compreende mais de 15 espécies, entre as quais somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são caracterizadas como patogênicas para o homem e outros vertebrados. Existem 13 sorotipos de *L. monocytogenes*, com destaque para os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b como os mais relacionados a infecções humanas, despontando o sorotipo 4b responsável pelo quadro de listeriose invasiva (septicemia, meningite), enquanto os sorotipos 1/2a e 1/2b prevalecem nos surtos de gastroenterite e localizações extraintestinais.

A *L. monocytogenes* pode ser considerada um patógeno oportunista, considerando que a suscetibilidade do hospedeiro, isto é, a condição ou o estado imunológico, é fundamental para o desenvolvimento da doença. Nesse caso, citam-se alguns fatores de risco, como neoplasias, gestação, idades extremas, diabetes, medicação imunossupressora (transplantados), portadores de HIV etc.

Salienta-se que a *L. monocytogenes* está enquadrada entre os 5 principais agentes de infecção de origem alimentar nos países desenvolvidos, embora a listeriose seja uma doença rara e com baixa incidência (0,1 a 10 casos por 100 mil habitantes), mas com níveis elevados de hospitalização (até 90%) e de letalidade (20% a 30%). Tal importância decorre principalmente da sua presença em laticínios, produtos cárneos, vegetais não cozidos, alimentos prontos para consumo etc., oscilando de 10% a 30%.

IMPORTÂNCIA DA COLETA E DO TRANSPORTE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS



Entre os principais fatores limitantes na detecção de patógenos, estão a complexa e abundante microbiota normal e os procedimentos incorretos de coleta e transporte do material fecal até o laboratório.

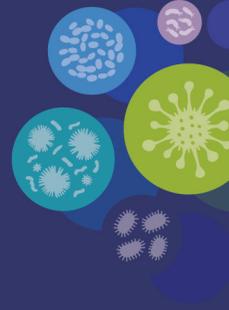
Após o nascimento, a microbiota autóctone (residente normal ou indígena) implanta-se em determinadas áreas anatômicas do trato intestinal. Em contraposição, a microbiota alóctone (não residente, não indígena e transiente) é detectada de maneira esporádica e acidental em qualquer sítio anatômico do sistema gastrointestinal. Os microrganismos patogênicos podem ser alóctones (patogênicos verdadeiros) ou autóctones (patogênicos oportunistas).

No adulto humano, a microbiota intestinal pode atingir 10^{14} células/g de fezes de seres procarióticos e eucarióticos. A predominância dos microrganismos é particularmente no ceco e no intestino grosso, onde podem atingir níveis $\geq 10^{11}$ unidades formadoras de colônias (UFC)/g de fezes. É possível diferenciar três níveis de microrganismos nessas áreas:

- 1 – **Microbiota dominante:** 99% da população, 10^9 - 10^{11} UFC/g de fezes, constituído de bactérias anaeróbias estritas.
- 2 – **Microbiota subdominante:** 0,99% da população, 10^7 - 10^8 UFC/g de fezes com predominância de anaeróbios facultativos.
- 3 – **Microbiota residual:** 0,01% da população, $<10^7$ UFC/g de fezes contendo gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* e seres eucarióticos (leveduras e protozoários).

Desse modo, o êxito na detecção de enteropatógenos está associado ao emprego de procedimentos corretos que envolvem desde a coleta e o transporte até o processamento e a caracterização do agente envolvido.

COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA O LABORATÓRIO



O quadro clínico apresentado pelos indivíduos, as características das fezes e a patologia podem ajudar a estabelecer o diagnóstico diferencial, bem como indicar os espécimes que deverão ser obtidos para a confirmação diagnóstica.

A coleta, a conservação e o transporte do material clínico constituem a base do sucesso na definição etiológica do processo infeccioso, cabendo ao laboratório de microbiologia normatizar e supervisionar esses procedimentos.

Para a colheita de material clínico, determinados critérios devem ser obedecidos, como:

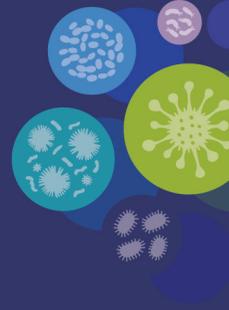
- ▶ Tipo e quantidade de amostra a serem analisados: uma pequena quantidade de fezes sólidas/semisólidas, ou em um terço do recipiente, no caso de fezes aquosas, deve ser coletada em um recipiente descartável estéril de ± 40 mL com tampa de rosca. A coleta em swab retal não é recomendada, pois o material obtido nunca é adequado para todos os testes ou para a inoculação de todos os meios utilizados na cultura.
- ▶ Obtenção da amostra antes da antibioticoterapia, tomando cuidado para não sujar a parte externa do recipiente. As amostras não devem ser coletadas da fralda, do lençol ou de recipientes.
- ▶ Realizar a coleta na fase da doença suspeita.
- ▶ Condições que evitem contaminação.

A amostra deve ser imediatamente transportada para o laboratório. A manutenção e o transporte adequados do material são importantes na recuperação do agente infeccioso, considerando o intervalo entre a coleta e a realização do exame. O meio de transporte empregado deverá manter a viabilidade bacteriana, mas não deve permitir sua multiplicação. Ao receber as amostras clínicas, cabe ao laboratório determinar a ordem de prioridade para o processamento delas, tendo em vista que não devem ser semeadas fezes coletadas com mais de seis horas, sendo aconselhado o emprego de um método de conservação para aquelas que não tiverem processamento imediato.

Se houver atraso no transporte de amostras fecais ou se as amostras tiverem que ser enviadas por correio, um dos seguintes meios de transporte pode ser empregado:

- ▶ Meio de transporte Cary & Blair.
- ▶ Meio de transporte de Stuart.
 - Solução salina de glicerol tamponada com fosfato.
 - Coleta de fezes em papel filtro.

MEIOS DE CULTURA PARA TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO



Cary & Blair

Formulado para transporte de material fecal e consequente conservação dos microrganismos, uma vez que os patógenos e outros coliformes fecais sobrevivem bem nesse meio. A carência de uma fonte de nitrogênio impede consideravelmente a multiplicação de microrganismos e a composição nutritiva garante a sobrevivência deles.

Utilização: coletar as fezes com swab esterilizado e introduzir imediatamente no meio de cultura, de modo que a parte que contém o algodão fique no meio de cultura. Mantenha em temperatura ambiente até o momento de processamento. Não deixar o meio com a tampa aberta ou semiaberta após a sementeira.

Cary & Blair modificado

Meio de Cary-Blair com concentração final de 1,6 g/L de ágar. Meio utilizado para viabilizar o crescimento de microrganismos fastidiosos com baixa tolerância ao oxigênio. A adição de 0,5% de sangue desfibrinado de carneiro favorece a recuperação de isolados do gênero *Campylobacter* spp.

Água peptonada alcalina com tioglicolato e cistina

Indicada para transporte de swab fecal para análise de microrganismos sensíveis à presença de oxigênio.

Meio Stuart

Transporte de diversos materiais e consequente conservação dos microrganismos. Procedimentos de inoculação idênticos ao anterior.

Meio de Amies – meio Stuart modificado

Meio para favorecimento de bactérias fastidiosas, com substituição do glicerofosfato de sódio por uma solução balanceada de sais contendo tampão de sais inorgânicos o qual, dificultando a multiplicação bacteriana e melhorando a manutenção da permeabilidade celular, trazendo melhor recuperação das células bacterianas. A adição de carvão ativado ao meio tem demonstrado resultados positivos quanto ao isolamento do gênero *Campylobacter* spp.

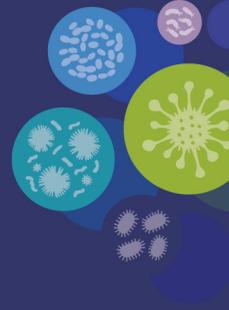
Salina glicerinada e tamponada

Indicada para transporte de fezes, mantendo a bactéria viável por ser um meio líquido tamponado. Para utilização, inocular 2 g da amostra de fezes em tubo com 10 mL do meio e homogeneizar. Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 12 a 18 horas.

Coleta em papel filtro

- ▶ Utilizar tiras de papel de filtro, tipo xarope ou mata-borrão, com dimensões de 2,5 cm de largura por 6,0 cm de comprimento.
- ▶ As fezes diarreicas ou emulsionadas em água devem ser espalhadas em dois terços de uma das superfícies do papel, com auxílio de um fragmento de madeira (palito individual) ou de qualquer outro material semelhante disponível no momento.
- ▶ As tiras de papel de filtro devem ser acondicionadas em invólucros plásticos após dessecar naturalmente. Sob essas condições, *Salmonella* spp. mantém-se viável por um período aproximado de 30 dias.
- ▶ Em fezes de doentes suspeitos de cólera, não dessecar o espécime, mantê-lo úmido, colocando no envoltório plástico e mantendo a umidade.

COLETA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS



Fezes

Fezes de emissão espontânea – in natura

Essas amostras devem ser coletadas em recipientes de boca larga, limpos e/ou esterilizados, sendo mantidos sem processamento laboratorial por um período máximo de duas horas após a coleta. Não sendo possível o cumprimento dessa recomendação, as fezes deverão ser mantidas em refrigerador e transportadas em gelo em até 24 horas após a coleta.

Como amostra deve ser tomada de 0,5 g a 2 g de fezes, e, quando da presença de sangue ou muco, selecione essa porção para a avaliação laboratorial.

Evitar a coleta de espécimes fecais a partir das roupas do paciente, da superfície de camas e/ou do chão.

Swab retal

Umedecer o swab em solução salina fisiológica ou água destilada, esterilizadas.

Introduzir o swab na ampola retal do paciente ou comunicante, comprimindo-o em movimentos rotatórios suaves, por toda sua extensão.

Inocular no meio de transporte Cary & Blair ou em 10 mL a 20 mL de água peptonada alcalina (pH 8,4 a 8,6).

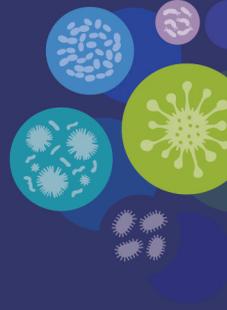
Processar no período até duas horas e, caso não seja possível, introduzir o swab no meio de Cary & Blair. Nesse meio de transporte, o espécime pode ser conservado por 24 a 72 horas, quando mantido em temperatura ambiente, ou por até cinco dias em refrigeração (4°C a 8°C).

Swab fecal

Recolher parte das fezes com auxílio de um swab. Introduzir o swab no meio de transporte Cary & Blair ou água peptonada alcalina. Processar as amostras acondicionadas em tubos de água peptonada alcalina até 12 horas após a coleta, se mantidas em temperatura ambiente; e por cinco dias, se mantidas sob refrigeração.

As amostras coletadas através de swab devem ser semeadas de imediato se não forem acondicionadas em meio de transporte.

EXAME DIRETO DE FEZES: AVALIAÇÃO PRESUNTIVA



- ▶ A presença de piócitos e de células mononucleares indica processo inflamatório.
- ▶ A presença de polimorfonucleares é indicativa de síndrome disenteriforme ou colite determinada por patógenos invasivos.
- ▶ Células mononucleares podem predominar em pacientes com febre tifoide.

Observações

- ▶ O material recolhido deve ser representativo do processo infeccioso, evitando contaminações, e deve-se procurar o melhor sítio da coleta.
- ▶ A coleta deve ser efetuada na fase aguda do processo infeccioso e antes da utilização de antimicrobianos.
- ▶ Swabs retais devem ser priorizados para pacientes com infecção ativa, do mesmo modo que em crianças ou indivíduos com dificuldade de obtenção de amostras.
- ▶ A pesquisa de *Salmonella Typhi* nas fezes é indicada a partir da segunda semana da doença, assim como na convalescença e na detecção de portadores. No estado de convalescença, é indicada a coleta de duas amostras do material com intervalo de 24 horas.
- ▶ Para portadores assintomáticos, particularmente aqueles envolvidos na manipulação de alimentos, recomenda-se a coleta de sete amostras sequenciadas. Sete dias após o término do tratamento com antimicrobianos, devem-se realizar três coproculturas, com intervalos de 30 dias. Caso uma delas seja positiva, essa série pode ser suspensa e o indivíduo deve ser novamente tratado.
- ▶ Fezes e aspirados gastrintestinais podem ser transportados sob refrigeração em frascos estéreis, e biópsias podem ser conservadas com salina em frasco estéril.
- ▶ Em geral, o meio de transporte inviabiliza a pesquisa de leucócitos nas fezes, sendo indicado enviar fezes frescas para o exame.
- ▶ Quando possível, devem-se selecionar porções de fezes contendo muco, e/ou sangue, e/ou pus.
- ▶ Consideram-se materiais impróprios para processamento fezes ou material do trato digestivo transportados em temperatura ambiente sem meio de transporte, swab seco ou ausência de fezes e biópsias secas.
- ▶ Todos os espécimes devem ser rotulados, identificados, devidamente embalados, acompanhados de informações clínicas e epidemiológicas e transportados para o laboratório em condições adequadas de preservação (refrigeração ou temperatura ambiente), condição esta que depende do tipo de amostra e da metodologia a ser empregada no diagnóstico.

Sangue

O hemocultivo tem interesse especial no caso de febre tifoide e paratifoide, porém não é constantemente positivo. Os percentuais de positividade, na ausência de tratamento antibiótico, são de 90% durante a primeira semana de evolução, 75% na segunda, 40% na terceira e 10% na quarta semana.

Os hemocultivos são negativos nas síndromes de infecções transmitidas por alimentos (infecções intestinais), no entanto determinados patógenos, quando em indivíduos imunocomprometidos, podem determinar septicemia e, nesse caso, pode-se colher sangue para tentativa de isolamento do agente. A hemocultura, assim como a pesquisa no líquido (LCR), é o processo indicado nos casos de listerioses, e também o primeiro método na bacteremia da iersiniose. Adota-se a mesma orientação técnica especificada para as febres tifoide e paratifoide: separar uma alíquota de sangue (2 mL a 3 mL) sem anticoagulante para a execução das análises sorológicas.

Principais cuidados para coleta

- ▶ A coleta deve ser efetuada antes da utilização de antimicrobianos.
- ▶ A superfície dos frascos de cultivo deve ser desinfetada com álcool 70°GL.
- ▶ Deve ser feita assepsia do sítio de punção (álcool 70°GL ou solução iodada) em movimentos concêntricos do centro para extremidade.
- ▶ A amostra coletada deve ser enviada ao laboratório imediatamente ou em até 30 minutos, em temperatura ambiente, ou incubada por 24 horas a 36°C, e encaminhada em seguida ao laboratório em temperatura ambiente.

Volume para cultura

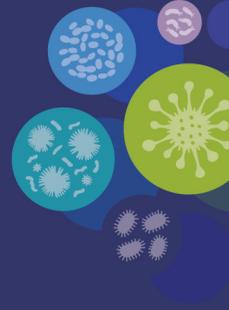
Coletar três amostras de sangue com intervalos de 30 minutos entre as amostras.

Adultos: 20 mL, coletados com seringa, divididos em duas alíquotas para inoculação em dois frascos de meio de cultura (inocular 10 mL em 100 mL de meio enriquecido (exemplo: TSB-Trypticase Soy Broth), acrescido de anticoagulante SPS (polianetolsulfonato sódico)).

Crianças: inocular 1 mL/10 mL de meio enriquecido, acrescido de SPS.

Peso	Volume total
<1,5 kg	1 mL
<4 kg	1 mL
4 kg a 13 kg	3 mL
13-25 kg	10 mL
>25 kg	20 mL

TRANSPORTE



- ▶ Utilizar, na medida do possível, *containers* plásticos ou de isopor para manutenção por período curto (duas a quatro horas) de transporte das amostras.
- ▶ Envolver os isolados ou espécimes clínicos com plástico e colocá-los em outra embalagem no interior da caixa de transporte.
- ▶ Manter as fichas contendo as informações clínicas e/ou epidemiológicas à parte de espécimes clínicos.
- ▶ Para reutilização dos *containers* para transporte, efetuar a desinfecção utilizando solução de hipoclorito de sódio (100 ppm).

Uso da PCR para diagnóstico bacteriano

Na atualidade, para o diagnóstico de diferentes enteropatógenos, além dos métodos clássicos, podem ser utilizados diferentes modalidades da proteína C reativa (PCR). Esta pode ser realizada diretamente da amostra clínica, ou a partir do meio de enriquecimento, ou ainda para a identificação conclusiva do patógeno isolado. Sua utilização visa minimizar o tempo para obtenção e divulgação de resultados, ou ainda para o reconhecimento de diferentes características de relevância em saúde pública. Alguns protocolos baseados na PCR e em kits comerciais detectam alvos específicos de patógenos diretamente nas amostras fecais, entretanto à luz do conhecimento atual ofertam taxas positivas mais baixas. As metodologias nas quais é empregado o enriquecimento da amostra fecal antes da detecção da PCR vêm ofertando um aumento da sensibilidade.

O principal fator limitante para a PCR é a contaminação, um resultado direto da natureza altamente sensível da amplificação ou da grande quantidade de alvo amplificado obtido. É vital que o fluxo de trabalho correto seja seguido, a fim de reduzir a contaminação e garantir que boas práticas de laboratório sejam seguidas.

Para minimizar e reduzir a contaminação, que pode ocorrer em cada etapa de uma PCR, as diferentes áreas de um laboratório devem estar fisicamente separadas. De acordo com o tipo de ensaio molecular, o número ideal de separações é diferente, sendo necessárias no mínimo duas grandes áreas. A primeira é conhecida como a “área limpa”, anterior à amplificação (para preparo de reagentes e da amostra), e aquela realizada após a amplificação, geralmente conhecida como a “área suja” (áreas analítica e pós-analítica).

Entre essas duas áreas, o fluxo de trabalho deve ser unidirecional, e a pressão relativa do ar e a direção devem ser diferentes. O equipamento, os insumos e os jalecos devem ser separados para cada área. É útil marcar com códigos ou cores distintas os itens utilizados nas diferentes áreas para monitorar o movimento entre as diferentes áreas. Além disso, luvas devem ser usadas durante todo o processo nas diferentes áreas.

Cuidados na coleta e na manutenção da amostra para diagnóstico por PCR

A coleta da amostra para diagnóstico molecular é muito importante, particularmente quando essa análise é feita diretamente da amostra clínica, tendo em vista que algumas substâncias químicas podem inibir o ensaio molecular. Por exemplo, alguns anticoagulantes, como a heparina, podem levar à inibição do ensaio molecular, sendo necessários métodos trabalhosos para sua remoção antes de iniciar qualquer ensaio. Portanto o método preferido de coleta é o uso de tubo revestido com EDTA.

As amostras de fezes coletadas em frascos devem ser transportadas de acordo com as recomendações do teste a ser empregado. Alguns protocolos de extração de DNA envolvem a diluição da amostra com solução salina tamponada (pH 7.4), com subseqüentes centrifugação e filtração para eliminação de restos celulares. Como a maioria dos microrganismos fica no filtrado, este pode ser submetido à extração de DNA.

Amostras de LCR devem ser transportadas a 2°C-8°C. Caso não possam ser processadas imediatamente, elas podem ser congeladas (-20°C ou menos), removendo as hemácias presentes e congelando a amostra, sendo o transporte realizado preferencialmente com gelo seco.

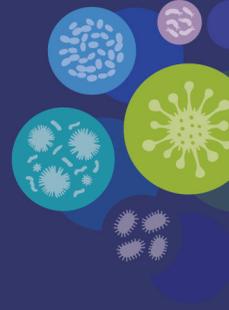
A medula óssea deve ser aspirada utilizando-se uma seringa com EDTA. Para extração de DNA, o aspirado de medula óssea pode ser armazenado temporariamente por até 72 horas a 2°C-8°C antes do processamento. Caso seja necessário armazenar por tempo superior a esse, devem-se remover os eritrócitos, que podem liberar heme e inibir a reação de PCR e congelar a amostra a -20°C (por vários meses).

Swabs e manchas de sangue seco também são dispositivos de coleta apropriados, no entanto deve-se ter cautela com a utilização de swabs imersos em meio de coleta que contenha em sua base a formalina, a qual inibe a PCR e deve ser removida antes do teste. Sangue total e manchas de sangue seco podem ser armazenados a 4°C por até 24 horas, mas armazenamento em longo prazo deve ser a -20°C.

As amostras de plasma são estáveis de 2°C-8°C por até cinco dias, suportando tempos maiores quando congeladas; recomenda-se que sejam transportadas refrigeradas e congeladas posteriormente. O soro deve ser mantido congelado e transportado com gelo seco. O sangue total é estável em temperatura ambiente por 24 horas, para análise de DNA, e por até 8 dias, quando resfriado (2°C-8°C).

Depois de isolar o DNA das amostras, é recomendado que este seja armazenado abaixo de 0°C, em tubo de plástico, hidrofóbico e com tampa de vedação, preferencialmente de borracha, para prevenir a evaporação e minimizar a atividade de degradação determinada pelas DNAses. Os tubos de polialômeros e alguns de polipropileno são mais apropriados para armazenamento do DNA; tubos de polietileno e a maioria dos de polipropileno não tratados causam significativa adsorção de DNA no tubo. O DNA purificado pode ser armazenado em tampão tris-EDTA (TE), pH 7.2, por 26 semanas em temperatura ambiente, por 1 ano a 2°C-8°C (na ausência de DNAses), por até 7 anos em freezer a -20°C, e por período superior a -70°C. O freezer utilizado não deve ser do tipo *frost free*, cujo sistema resulta na oscilação da temperatura, levando à quebra dos ácidos nucleicos.

MECHA – SWAB DE MOORE



O uso do swab de Moore é um processo simples e eficaz para uma avaliação quantitativa, sendo utilizado para coleta de amostras de águas residuais e água contaminada com *Vibrio cholerae* ou outros patógenos. O apetrecho é colocado em local previamente definido durante um período de 24 a 48 horas, submerso a uma profundidade de 15 a 20 centímetros. O tempo da manutenção dependerá do nível de vazão da corrente fluida e da turbidez do líquido.

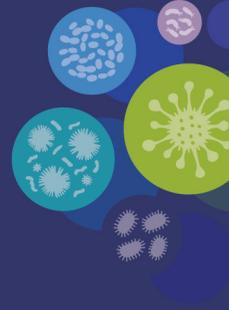
Após esse período, recomenda-se usar luvas de látex e alterná-las entre as tomadas de amostras para evitar a contaminação cruzada. Devem-se retirar as amostras com cuidado e colocá-las em recipientes de vedação adequada para o seu tamanho, ou em saco plástico, sempre identificando a data, a hora e o local referentes ao ponto de coleta. É necessário transportar em temperatura ambiente e, no caso de *Vibrio cholerae*, enviar rapidamente ao laboratório para evitar o aquecimento ambiental do material durante o transporte ao laboratório (período de duas a seis horas).

Se o tempo entre a coleta e o transporte for ≥ 8 horas, imergir o swab em água peptonada alcalina antes do transporte para garantir a recuperação para *Vibrio cholerae*.

Após a chegada ao laboratório, adicionar 300 mL a 500 mL de APA 3x concentrada, homogeneizar e transferir o inóculo de 1 mL para 10 mL para APA normal e incubar a 35°C-37°C. Decorridas seis horas, repicar o crescimento mais superficial para agar TCBS.

Enviar logo ao laboratório (o ideal é entre duas a seis horas). Resiste no máximo até 24 horas sob refrigeração.

REFERÊNCIAS



AMRI, A. *et al.* Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. **J. Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1350-1355, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Guidelines for Safety Work Practices in Human and Animal medical Diagnostic Laboratories**. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, 2012. Disponível em: <http://ehsu.hkbu.edu.hk/Endorsed%20safety%20guidelines%20for%20handling%20human%20clinical%20specimens.pdf>. Acesso em: 15 maio 2019.

FACCIOLÁ, A. *et al.* *Campylobacter*: from microbiology to prevention. **Review J. Prev. Med. Hyg.**, v. 58, p. E79-E92, 2017.

FARFÁN-GARCÍA, A. E. *et al.* Mecanismos de virulência de *Escherichia coli* enteropatogena. **Rev. Chilena Infectol.**, v. 33, n. 4, p. 438-450, 2016.

FRATAMICO, P. M. *et al.* Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-8. 2016.

GASANOV, V.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods the isolation and identification of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiol. Review**, v. 29, p. 851-879, 2005.

HENNEKINNE, J.-A.; BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 35, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.; MCIVER, C. J. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 349, 2016.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clin. Microbiol. Review**, v. 34, l. 2, e00174-20 2021.

LOMONACO, S.; NUCERA, D.; FILIPELLO, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and The United State. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 35, p. 172-183, 2015.

PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. Intern. **J. Systemat. Evolut. Microbiology**, v. 68, n. 6, 1 Jun. 2018. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002786>. Acesso em: 15 maio 2019.

ROTUNDO L. *et al.* Evaluation of PCR-based methods for the identification of enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* in sprouts. **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 291, p. 59-64. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. Geneva: WHO, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Technical Guidelines for Integrated Disease Surveillance and Response in the African Region**. Geneva: WHO, 2010.

WU, S. *et al.* Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 176, 2016.

YANG, S.-C. *et al.* Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Arch. Microbiol.**, v. 199, p. 811-882. 2017.

**AGENTES ETIOLÓGICOS (ENTEROBACTÉRIAS)
DAS DTA E DDA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
E COLETA DE MATERIAL**

Anexo A – Coleta e remessa de amostras clínicas para diagnóstico (coprocultura) de enterobactérias e *Vibrio cholerae*

Agentes bacterianos	Fase da coleta	Material biológico	Procedimentos gerais de coleta	Preservação e transporte
Enterobacteriaceae	Fase aguda (duas amostras por paciente).	Swab retal Swab fecal Fezes in natura.	Swab retal: umedecer o swab em solução fisiológica ou em água destilada esterilizada e introduzir na ampola retal do paciente ou comunicante, comprimindo-o em movimentos rotatórios suaves por toda a extensão dessa região.	O processamento laboratorial deve ser efetuado em até duas horas após a coleta e, caso não seja possível, deve-se introduzir o swab retal ou fecal impregnado de fezes no meio de conservação Cary & Blair. Nessa condição, sobrevivem por uma a duas semanas em temperatura de refrigeração (4°C a 8°C).
Salmonella Typhi	Pacientes com >14 dias (2ª a 5ª semana) de evolução: coprocultivo seriado (intervalo de 3 dias). Convalescença: 2 amostras com intervalo de 24 horas. Portadores assintomáticos: sete amostras sequenciais. Sete dias após tratamento com antimicrobianos: realizar 3 coproculturas intervalo de 30 dias.	Swab retal Swab fecal Fezes in natura.	Swab fecal: devem ser colhidos de 0,5 g a 2 g de fezes em frasco de boca larga e, quando da presença de sangue ou de muco, essa deve ser a porção selecionada para a avaliação laboratorial. Introduzir o swab no frasco contendo as fezes. Evitar a coleta de espécimes fecais a partir das roupas do paciente, da superfície de camas e/ou do chão.	Para a pesquisa de <i>V. cholerae</i> , inocular o swab em Cary & Blair ou em 10 mL-20 mL de água peptonada alcalina (APA), pH 8,4-8,6. Manter em temperatura ambiente. Não refrigerar ou congelar.
			Fezes de emissão espontânea: essas amostras devem ser coletadas em pequenos recipientes, de vidro ou polietileno, de boca larga, limpos e/ou esterilizados. Devem ser colhidos de 3 g a 5 g de fezes e, quando da presença de sangue ou de muco, essa deve ser a porção selecionada para a avaliação laboratorial.	O material deverá ser analisado em até duas horas após a coleta, quando em temperatura ambiente, ou em seis horas sob refrigeração (4°C a 8°C). Nos locais onde não existam facilidades para a remessa imediata, utilizar soluções preservadoras, como a fórmula de Teague-Clurman. Manter em temperatura ambiente por até 48 horas ou até 96 horas, se conservado de 4°C a 8°C. Não usar para <i>V. cholerae</i>.
Vibrio cholerae	Fase aguda (duas amostras por paciente).	Swab retal Swab fecal Fezes in natura.	Coleta de fezes em papel-filtro (2,5 cm de largura por 6,0 cm de comprimento). As fezes diarreicas ou suspensas em água devem ser espalhadas em dois terços de uma das superfícies do papel, de acordo com a técnica de Dold & Ketterer (1944).	Acondicionar em invólucros plásticos, vedados, para evitar a dessecação. Essa precaução adotada visa manter a viabilidade de espécies da família Vibrionaceae. Para a família Enterobacteriaceae, as fezes devem estar dessecadas, naturalmente. Viabilidade: até 30 dias.

Anexo B – Coleta, preservação e transporte de amostras clínicas extraintestinais para o diagnóstico de *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi*

Métodos de diagnóstico	Fase da Coleta	Procedimentos de coleta	Preservação e transporte
Hemocultura	Pacientes com <14 dias de evolução (pico febril).	Por punção venosa. Nos adultos, o volume deverá ser de 3 coletas de 10 mL com intervalo de 1 hora. Para crianças (duas coletas), devem ser tomados volumes variáveis de acordo com o peso.	O processamento laboratorial deve ser imediato ou realizado em até 30 minutos, em temperatura ambiente ou inocular, em frascos de meio de cultura (10 mL/100 mL de caldo biliado ou caldo TSB, acrescido de anticoagulante SPS – polianetolsulfonato sódico). Incubar 24 horas a 36°C e enviar para o laboratório em temperatura ambiente. O coágulo sanguíneo deve ser fragmentado com auxílio de uma pipeta ou de um bastão esterilizado, e introduzido no frasco com meio de cultura.
Cultivo de aspirado medular	Pacientes que receberam antibióticos.	Punção de medula óssea. Volume: 2 mL (mínimo: 0,5 mL).	Só deve ser realizada em hospital sob orientação médica. Inocular logo após a coleta, acompanhando o esquema de sequência dos procedimentos técnicos da hemocultura.
Urina	Coletar urina no fim do período febril, na fase de convalescença, antes da oitava semana desde a instalação da doença.	Coletar de 50 mL a 100 mL de urina (após o 1º jato) em frasco estéril de plástico ou vidro de boca larga e tampa de rosca.	Processar em até duas horas após a coleta, refrigerada.
Cultivo da secreção biliar	Só deve ser realizada sob orientação médica em hospital.	Promover a antissepsia com álcool 70%; punção percutânea ou cirúrgica – procedimento realizado por médicos.	Direto no frasco de hemocultura ou em frasco estéril, e processar em até duas horas após a coleta.

Anexo C – Coleta, preservação e transporte de amostras clínicas extraintestinais para o diagnóstico de enteropatógenos bacterianos

Espécimes	Fase da coleta	Procedimentos de coleta	Preservação e transporte
Sangue	Coletar na fase aguda da doença, antes de iniciar tratamento antimicrobiano, coletar as amostras ao mesmo tempo, em locais diferentes.	Sepses, endocardite e infecções localizadas: duas ou três amostras em punções diferentes. Fazer antisepsia da pele com álcool 70°GL, de dentro para fora. Adultos: 10% do volume total do frasco/total de 3 amostras. Crianças: 0,5 mL a 3 mL de sangue/total de 2 amostras. Colocar em frasco para hemocultura (caldo TSB acrescido de SPS).	Manter o frasco em temperatura ambiente por até 30 minutos ou incubar por 24 horas a 35°C e enviar ao laboratório em temperatura ambiente. Nunca refrigerar.
LCR (líquido cefalorraquidiano)	Coletar antes de iniciar o tratamento: 0,5 mL a 2 mL/amostra.	Só deve ser realizada em hospital, por equipe médica especializada. Fazer a antisepsia da pele com álcool 70% de forma circular e de dentro para fora. Frasco estéril.	Enviar imediatamente ao laboratório em temperatura ambiente. Congelar utilizar em testes moleculares e estocar o restante.
Lesões superficiais	Limpar a superfície com solução salina estéril.	Se o abscesso estiver fechado, de preferência aspirar com agulha a amostra da base ou da parede da lesão. Em abscesso, ou ferida aberta, introduzir um swab dentro da lesão, sem tocar a área superficial.	Enviar imediatamente ao laboratório em temperatura ambiente ou refrigeração a 4°C por até 1 hora.
Urina	Antes do início e no final do tratamento. Sempre que possível, coletar as amostras pela manhã.	Assepsia prévia dos genitais com água e sabão neutro. Coletar o jato médio da urina. No caso de neonatos, pode-se usar o saco coletor de urina ou punção supra púbica. A coleta deve ser feita pela manhã, ou após retenção vesical de duas a três horas. Quando utilizar saco coletor, trocar o mesmo de 30 em 30 min/1 amostra.	Levar imediatamente ao laboratório sob refrigeração a 4°C.

Anexo D – Coleta, preservação e transporte de amostras ambientais

Material	Procedimentos de coleta	Preservação	Transporte
Águas de consumo humano	Coletar, em frascos de boca larga, no mínimo 5 L de água. Para pesquisa de <i>V. cholerae</i> : 450 mL de água em 50 mL de APA 10 vezes concentrada.	Água de abastecimento clorada, adicionar 0,1 mL de solução aquosa 10% tiosulfato sódico para 100mL.	Transporte: em temperatura ambiente: 2 h/4°C-10°C no máximo 30 horas. O transporte em APA é feito em temperatura ambiente (≈25°C).
Águas de rios, lagos e outras águas superficiais.	Após seleção do ponto de coleta, submergir frascos de boca larga até uma profundidade de 20 cm a 30 cm.	Coletar, no mínimo, 5 L de água.	Transportar em temperatura ambiente (≈25°C) por período <2 horas. Sob refrigeração (4°C a 10°C): 24 horas.
	Técnica de Moore (swab de Moore): Preparo: tiras de gaze dobrada de 120 cm de comprimento X 15 cm de largura envolvidas em arame; evitando comprimir, amarrar o centro com linha de nylon e esterilizar em autoclave. Na falta da haste, introduzir a gaze dobrada em rede de nylon.	Manter a haste metálica ou a rede de nylon imersa no efluente, em riachos, rios, lagos, canais etc., por três a cinco dias. Recolher as amostras em sacos plásticos ou em frascos de boca larga.	
Água do mar ou estuário	Para pesquisa de <i>V. cholerae</i> : 450 mL de água em 50 mL de APA 10 vezes concentrada.	Temperatura ambiente (≈25°C).	APA sem NaCl e APA com NaCl 1%.
Águas residuais	Colher de 100 mL a 500 mL de água em frascos de boca larga ou usar swab de Moore.	Para <i>V. cholerae</i> , transferir para frascos com 100 mL de APA 2X concentrada ou diretamente no frasco.	Transportar em temperatura ambiente.

Conte-nos o que pensa sobre esta publicação.

Clique aqui e responda a pesquisa.

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
bvsmg.gov.br/bvs

DISQUE SAÚDE **136**



MINISTÉRIO DA
SAÚDE

