

I Encontro Catarinense de Controle de Infecção em UTI

*Investigação laboratorial: coleta,
acondicionamento, qualidade da amostra
e interpretação dos resultados*

*Florianópolis
27/11/09*



Cássia M Zoccoli

Solicitação médica

- **Requisição Médica**
 - Nome do paciente
 - Enfermaria, leito, andar
 - Médico requisitante (de forma legível/carimbo)
 - Material e exames solicitados
 - Suspeita clínica
 - Antimicrobianos
 - Data da solicitação
- **Id. Material**
 - Nome legível
 - Local (número da enfermaria e leito)
 - Tipo de material
 - Data e horário da coleta

Coleta - lembretes

- Coletar a amostra antes do uso de antimicrobianos
- Considerar o estágio da doença
- Observar técnicas de anti-sepsia
- Coletar o material do local onde o agente suspeito possa ter mais chance de ser isolado

Transporte das amostras

- Transportar **imediatamente** a amostra ao laboratório para:
 - assegurar a sobrevivência e o isolamento do microorganismo
 - evitar atividade bactericida dos anestésicos
 - evitar erros de interpretação nas culturas quantitativas

AMOSTRA (cultura)	TEMPO IDEAL PARA PROCESSAMENTO
Aspirados (seringa)	Até 2h em TA
Culturas de Líquidos em geral (Ascítico, amniótico, pleural, peritoneal, pericárdio e diálise)	Até 2h após a coleta em TA
Cultura para anaeróbios	Volume superior a 2,0 mL : até 3h em seringa com ponta bloqueada.
Escarro e secreção traqueal	Até 1h ou refrigerar. Enviar a microbiologia no mesmo dia da coleta
Esperma	Imediatamente, ou no prazo máximo de 30 minutos em TA.
Fragmento de Biópsia em solução fisiológica	Até 2h em TA
Fezes em meio conservante	Enviar ao laboratório no mesmo dia da coleta
Fezes sem meio conservante	Até 1 hora ou colocar em meio conservante
Hemocultura	Inocular diretamente em meio de cultura próprio Armazenar o frasco com o sangue em TA e enviar ao setor de microbiologia em 12h
Lavado, aspirado e escovado brônquico	O mais breve possível em TA, processar em 1h.
Legionella, pesquisa na urina	Imediatamente após a coleta

AMOSTRA (cultura para germes comuns)	TEMPO IDEAL PARA PROCESSAMENTO
Liquor	Imediatamente ou no prazo máximo de 30 minutos em TA – não refrigerar
Micoplasma e Ureaplasma	Inocular imediatamente no meio de cultura ou transporte após a coleta
Ponta de cateter intravascular	Até 2h em TA
Raspado de córnea	Ideal é inocular diretamente nos meio de cultura e enviar imediatamente ao laboratório
Rotavirus, pesquisa	Até 6h após a coleta, ou até 72h refrigerada
Secreções em swab com meio de transporte	Até 2h em TA ou no prazo de máximo de 12h
Secreções em swab s/ meio de transporte	Imediatamente
Urina 1º jato Micoplasma e Ureaplasma	Inocular imediatamente no meio de cultura ou transporte após a coleta
Urina 1º jato	Imediatamente, ou até 4h refrigerada. Se ultrapassar 4h, mergulhar um swab com meio de transporte carvão ativado. Deixar o algodão absorver bem a urina.
Urina jato médio	Até 1 hora , ou então refrigerar por até 12h
TA = temperatura ambiente considerada de 20 a 25°C	

Hemocultura

Temas que serão abordados

- Pré-analítica (pré-exame)
 - Volume de sangue e solicitação médica
 - N°. de punções e anti-sepsia
 - Pico febril
 - Frascos aeróbios x anaeróbios
 - Sangue colhido de cateter
- Pós-analítico (pós-exame)
 - Resultado
 - Indicadores de qualidade

Como interpretar a solicitação médica

1. Hemocultura
 2. Hemocultura 1 amostra
 3. Hemocultura 2 amostras
 4. Hemocultura 3 amostras
 5. Hemocultura 4 amostras
 6. Hemocultura 2 amostras: aeróbios e anaeróbios
- Um conceito importante quando se fala em **hemocultura** é referir a **uma amostra** como sendo **o volume de sangue** obtido de **uma punção** que é **inoculado em um ou mais frascos**.

Coleta

Volume de sangue – adulto

- 2 a 3 amostras (coletas) de sangue de punções venosas diferentes
- Cada punção (20ml) = dois frascos - aeróbio e anaeróbio, 10ml em cada frasco
- Suficiente para isolar a grande maioria dos agentes causais de bacteriemias (variando de 40 a 60ml de volume total) – **paciente adulto**

Volume de sangue

- Número de microorganismos presentes no sangue
 - Adultos < 1 a 10 UFC/ml
 - Crianças 100 a 1000 UFC/ml
 - relatos de baixos níveis de bacteriemia (< 10 UFC/ml)
Kellogg et al., JCM, 2001
- Volume recomendado para adultos
 - 20 a 30 ml por punção

Magadia and Weinstein. 2001. Infect Dis Clin N Amer 15:1009

Volume de sangue

- Volume recomendado para crianças
 - 1 a 5 ml por punção – 1% do volume total de sangue do paciente (calculado pelo peso da criança) (CLSI M47-A 2007)
- Neonatos a 1 ano: 0,5 a 1,5ml única punção (Isenberg, CMPH, updated 2007)

Optimal Testing Parameters for Blood Cultures

F. R. Cockerill III,^{1,2} J. W. Wilson,² E. A. Vetter,¹ K. M. Goodman,⁴ C. A. Torgerson,¹ W. S. Harmsen,³ C. D. Schleck,³ D. M. Ilstrup,³ J. A. Washington II,⁵ and W. R. Wilson²

Table 1. Total number of all pathogens recovered related to the volume of blood cultured.

Patient group	No. of patients, by volume of blood			
	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
No endocarditis	235	305	346	371
Endocarditis	13	14	14	14

NOTE. A total of 40 mL of blood was obtained within a 30-min period; 20 mL was obtained separately from each of 2 phlebotomies and distributed equally between 1 aerobic (BACTEC Plus Aerobic/F resin; Becton Dickinson) and 1 anaerobic (BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F; Becton Dickinson) bottle.

Optimal Testing Parameters for Blood Cultures

F. R. Cockerill III,^{1,2} J. W. Wilson,² E. A. Vetter,¹ K. M. Goodman,⁴ C. A. Torgerson,¹ W. S. Harmsen,³ C. D. Schleck,³
D. M. Ilstrup,³ J. A. Washington II,⁵ and W. R. Wilson²

Table 2. Percentage increase for all pathogens recovered related to the volume of blood cultured.

Percentage increase for all pathogens, by volume of blood						
Patient group	20 mL vs. 10 mL	30 mL vs. 10 mL	30 mL vs. 20 mL	40 mL vs. 10 mL	40 mL vs. 20 mL	40 mL vs. 30 mL
No endocarditis	29.8	47.2	13.4	57.9	21.6	7.2
Endocarditis	7.7	7.7	0	7.7	0	0

NOTE. A total of 40 mL of blood was obtained within a 30-min period; 20 mL was obtained separately from each of 2 phlebotomies and distributed equally between 1 aerobic (BACTEC Plus Aerobic/F resin; Becton Dickinson) and 1 anaerobic (BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F; Becton Dickinson) bottle.

Punção venosa? Locais diferentes ou mesmo local?

Intervalo entre as coletas?

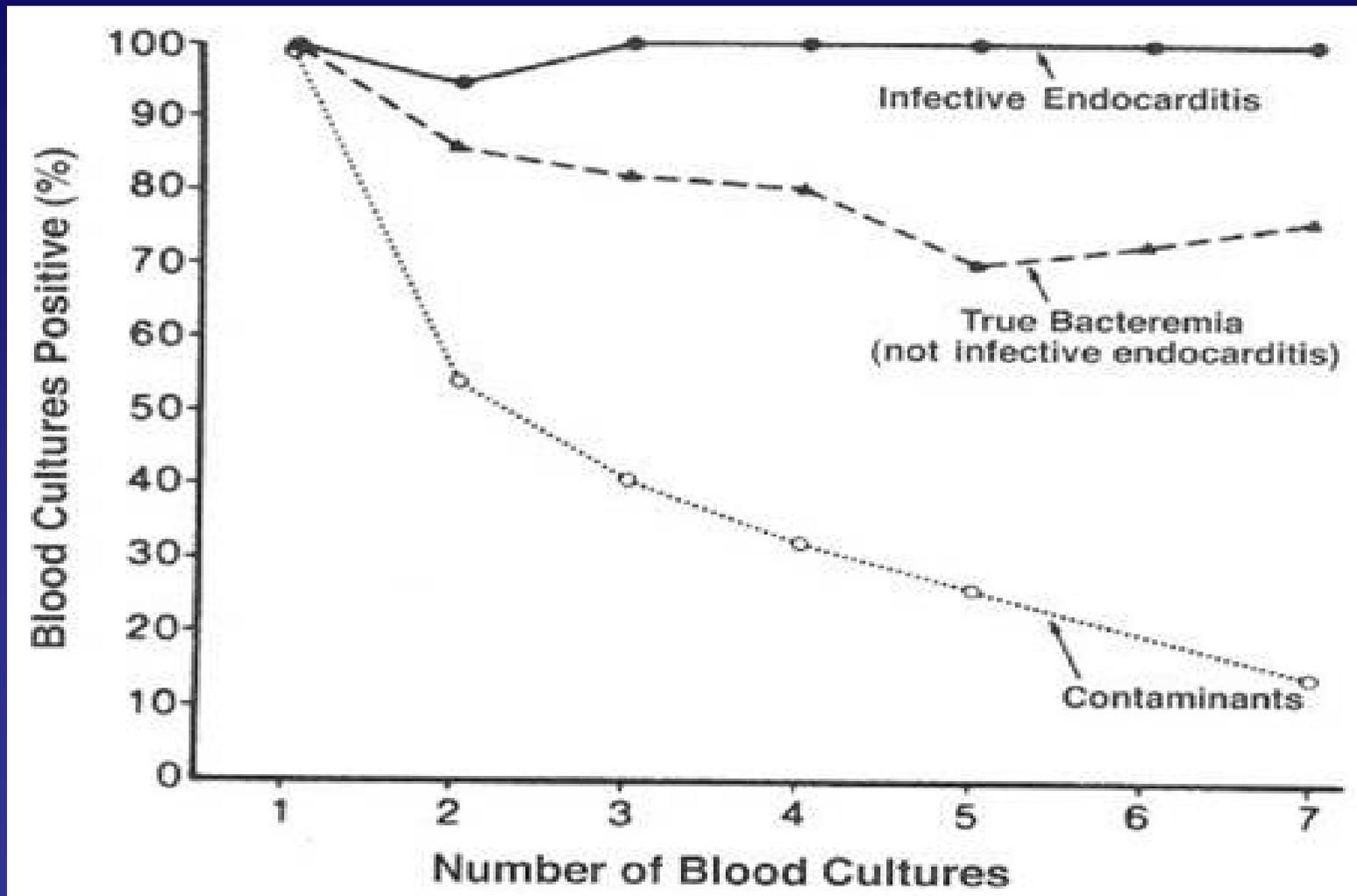
Cumitech Blood Culture IV , 2005, pg 5

Suspeita clínica	Recomendações Adultos
Bacteriemia, fungemia, meningite, osteomielite, artrite ou pneumonia (urgência na antibioticoterapia)	2 ou 3 amostras* colhidas sem intervalo, de punções venosas diferentes (40 a 60ml de volume total)
Febre de origem desconhecida: abscesso oculto, febre tifóide, brucelose	2 ou 3 amostras, sem intervalo, de punções venosas diferentes. Paciente estável: intervalo de 1 a 2h pode ser indicado. Se negativas em 24-48h de incubação obter mais duas amostras.
Bacteriemia ou fungemia com hemoculturas negativas	Métodos alternativos para isolamento: micobactérias, fungos (ou microrganismos fastidiosos)

Pacientes Imunodeprimidos

Fungemia e Micobacteriemia - lise e centrifugação ou frasco lítico (automação)

Importância de coletas separadas



Weinstein, M.P., et al. 1983. The clinical significance of positive blood culture: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. *Rev. Infect. Dis.* 5:35-53

Hemocultura – pico febril

- Em pacientes com febre constante: qualquer momento, sem intervalo – urgência!
- Em pacientes estáveis, com febres intermitentes: na ascensão da febre (45min a 1h - antes do pico febril)

Importante: volume e anti-sepsia!

Qual a proporção sangue/meio de hemocultura?

*Manual de Microbiologia Clínica para o
Controle de Infecção em Serviços de Saúde*



Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

[Introdução](#)

Módulo I

[Principais Síndromes Infecciosas](#)

Módulo II

[Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica](#)

Módulo III

[Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica](#)

Módulo IV

[Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos](#)

Módulo V

[Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica](#)



Qual a proporção sangue/meio de hemocultura?

Fatores que influenciam diretamente os resultados de hemoculturas:

Volume de sangue coletado por frasco:

O **volume** ideal corresponde a 10% do volume total do frasco de coleta. Quanto maior o **volume de sangue** inoculado no meio de cultura, por amostra, melhor recuperação do microrganismo, respeitando-se a proporção sangue/meio citada, pois o sangue em desproporção com o meio pode inibir o crescimento de microrganismos. Frascos que possibilitem uma coleta de até 10 ml são os mais indicados. Exemplo: frascos com 40 ml coletar de 4 ml a 5 ml de sangue. O anticoagulante recomendado é o SPS (Polianetolsulfonato sódico).

Sistemas convencionais: 10% (Cumitech e CLSI - 5 a 10% - 1:5 a 1:10)

Sistemas automatizados: esta regra não é aplicável

Exemplo: Bactec 9000 → 10 ml de sangue em 25 ml de meio (inf. a 1:5)

CLSI M47-A. *Principles and Procedures for Blood Cultures*. 2007
Cumitech 1C. *Blood Cultures IV*, 2005

Clorexidina alcoólica ou soluções iodadas para coleta de hemoculturas?

- Recomendação Cumitech 1B 1997
 - Etanol 70% - 30 segundos
 - Tintura de iodo 1 a 2% - 30 segundos ou povidine 10% - 60 segundos
- Isenberg 1998
 - Etanol 70%
 - Povidine 10% - 60 segundos
 - Etanol - 70%
- Barenfanger et al., 2004
 - Clorexidina alcoólica (2% em etanol a 70%)

Clorexidina alcoólica ou soluções iodadas para coleta de hemoculturas?

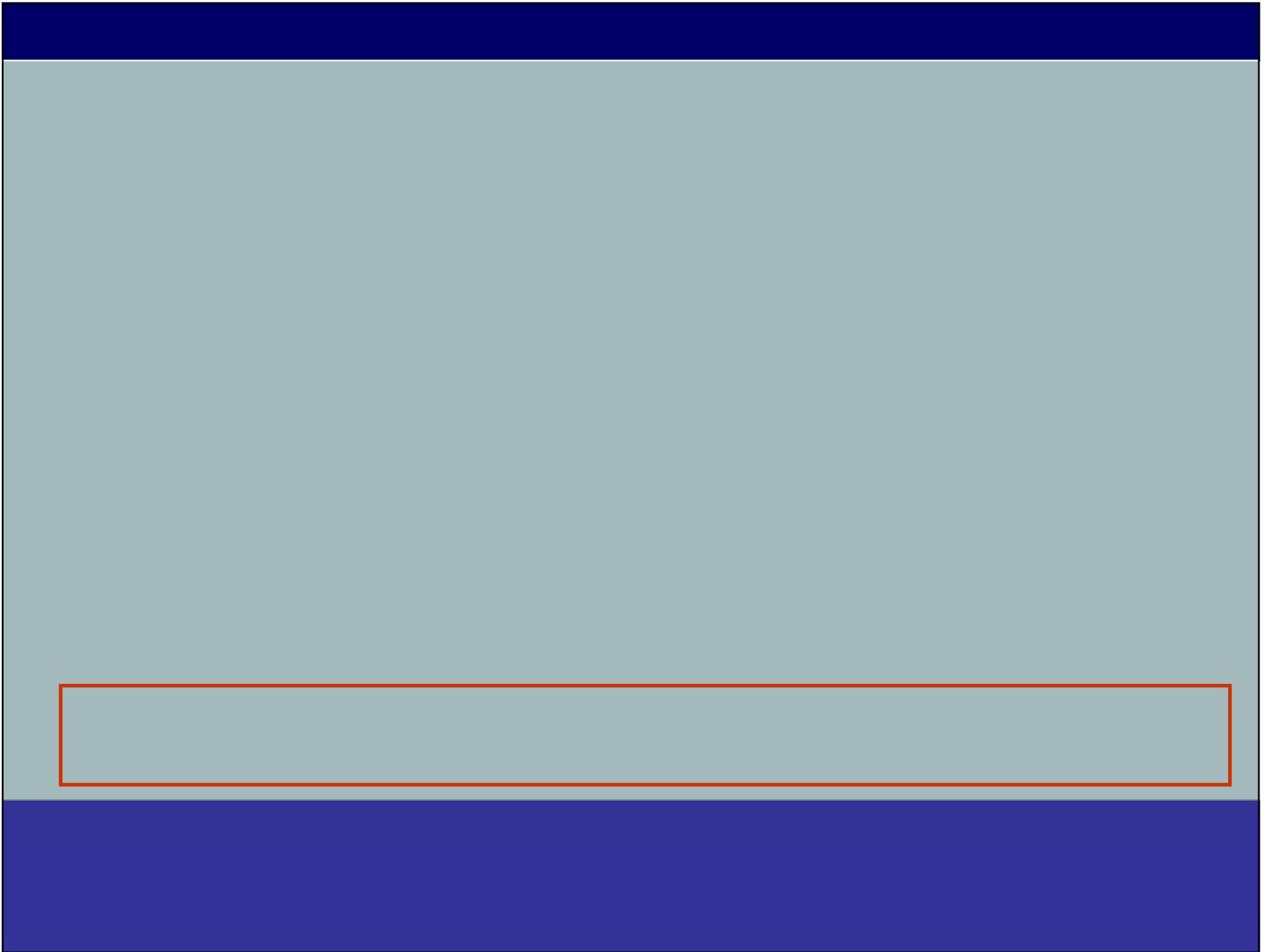
- Recomendação Cumitech 1C 2005
 - Etanol 70% - 30 segundos
 - Tintura de iodo 1 a 2% - 30 segundos ou povidine 10% - 60 segundos
- CLSI (2007)
 - Clorexidina (crianças - com mais de 2 meses) e tintura de iodo possui atividade superior - 30 segundos

*Frascos anaeróbios
Colher ou não colher ?*

Diversos trabalhos: importância da coleta de
frascos anaeróbios

Os microrganismos facultativos crescem
mais rapidamente em frascos anaeróbios
ou crescem apenas nestes frascos nas
primeiras 24h.

Clin Micro Newsletter, 14:17, 1992



*Frascos anaeróbios
Colher ou não colher ?*

Outro trabalho: raros casos de anaeróbios
estritos causando bacteriemias o que não
compensa colher frascos anaero

Clin Micro Newsletter, 17:16,1995.

Qual o tipo de paciente na instituição e casuística
antes de tomar uma decisão

Amostras de sangue de cateter Colher ou não colher ?

Pacientes neutropênicos – cateter de longa permanência

Colher amostras do cateter e de veia periférica simultaneamente

utilizado no auxílio diagnóstico de bacteriemias relacionadas a cateter

A diferença de ≤ 2 horas de tempo de detecção entre a amostra do cateter e a amostra periférica sugere bacteriemia relacionada ao cateter (automação).

J Clin Microbiol 39:274-278,2001.

Bacteremia Relacionada ao Cateter

- Volume coletado pelo cateter = volume coletado por punção periférica
 1. Coleta periférica
 2. Coleta pelo pelo cateter

Ex: 10 mL periférico = 10 mL pelo cateter
- Frasco p/ aeróbios
- Identificar os frascos corretamente
- Incubação em sistema automatizado

Ponta de cateter

- Cultura semi-quantitativa (método de Maki) - determinar a relação entre provável colonização e infecção.
- Cultura de Ponta de Cateter X Hemocultura.
- O resultado obtido depende da técnica de retirada da ponta de cateter (anti-sepsia, tamanho, etc).
- A presença de um n^o maior ou igual a 15 colônias (germe único) - ponta de cateter pode estar sendo fonte de infecção.

Hemocultura - Metodologia manual

- Atualmente, não é a metodologia mais indicada, por apresentar uma série de limitações
- Possível contaminação na manipulação das amostras - 2 a 3 subcultivos
- 5 a 7 dias de incubação - monitoramento manual
- Agitação moderada dos frascos são fatores importantes para uma maior positividade das amostras
- Volume de sangue por frasco (adulto) – 10ml – aumento da positividade, respeitando a proporção sg/meio de cultivo

Hemocultura - Metodologia automatizada

- Rapidez dos resultados
- Aumento da positividade
- Aumento da produtividade
- Geralmente, os protocolos são de cinco dias de incubação
- A grande maioria dos resultados positivos ocorre nas primeiras 48 horas
- Um grande ganho para pacientes internados
- Frascos: aero, anaero, c/inibidores de antibióticos e lítico (adulto e pediátricos) com agitação

First Notification of Positive Blood Cultures and the High Accuracy of the Gram Stain Report[∇]

Mette Sogaard,^{1,2*} Mette Nørgaard,² and Henrik C. Schönheyder¹

Department of Clinical Microbiology, Aalborg Hospital, Aarhus University Hospital,¹ and Department of Clinical Epidemiology, Aarhus University Hospital,² Aalborg, Denmark

Received 18 December 2006/Returned for modification 8 January 2007/Accepted 6 February 2007

TABLE 2. Performance characteristics of the Gram stain with culture-based identification as reference

Pathogen ^a	No. of correct Gram stain evaluations/total	% Sensitivity (95% CI)	% Specificity (95% CI)	% PPV (95% CI)	% NPV (95% CI)
Cocci					
Gram-positive, clusters	2,101/2,129	99.7 (99.4–99.9)	99.3 (98.9–99.5)	98.7 (98.1–99.2)	99.8 (99.7–99.9)
Gram-positive, chains/diplococci	707/818	96.8 (95.4–97.8)	99.8 (99.6–99.9)	98.7 (97.6–99.3)	99.5 (99.3–99.7)
Gram negative	35/37	92.1 (78.6–98.3)	100 (99.9–100)	94.6 (81.8–99.3)	100 (99.9–100)
Rods					
Gram positive	566/584	91.3 (88.8–93.4)	99.7 (99.5–99.8)	96.9 (95.2–98.2)	99.0 (98.7–99.2)
Gram negative	2,175/2,217	98.7 (98.2–99.2)	98.9 (98.5–99.2)	98.1 (97.5–98.6)	99.2 (98.9–99.5)
Yeasts	90/92	97.8 (92.4–99.7)	100 (99.9–100)	100 (96.0–100)	100 (99.9–100)

^a Pathogens are grouped according to their Gram stain characteristics, morphology, and arrangement.

Reportando resultados preliminares...

Hemocultura 2 amostras (aero e anaero): 4 frascos de duas punções venosas diferentes

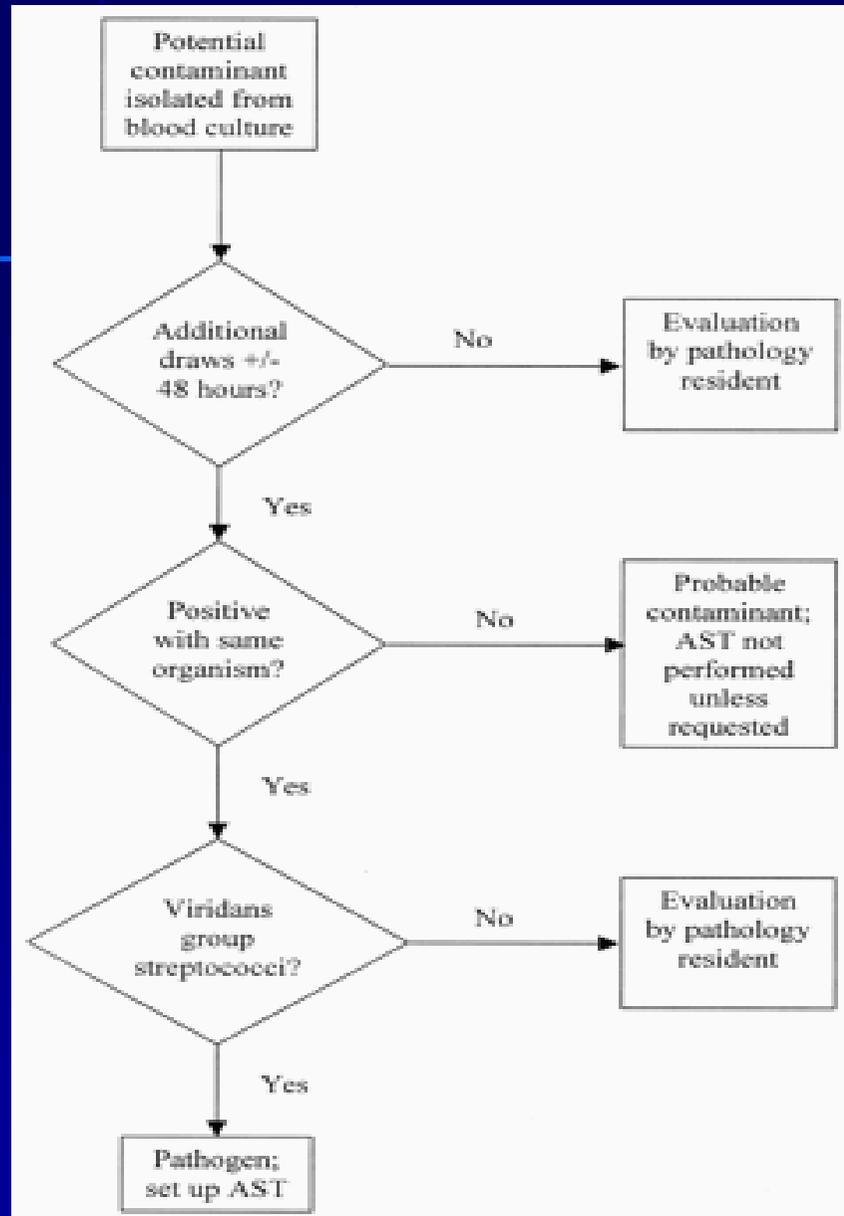
Frasco aeróbio: ausência de crescimento

Frasco anaeróbio: coco gram-positivo em cadeia sugestivo de *Streptococcus* sp. (resultado preliminar)

Informação clara?

Como o médico irá interpretar o resultado?

Fluxograma para interpretação das hemoculturas



Prováveis contaminantes

Staphylococcus coag (-) ??

Difteróides-Corynebacterium spp.

Micrococcus spp.

Bacillus spp.

Streptococcus grupo viridans

Propionibacterium spp.

Pseudobacteremia

(Bates et al. JAMA 265, 1991)

- 94 pacientes (episódios falsos positivos)

3,5	dias hospitalares (extras)
\$ 4.985	quartos extras
\$ 558	RX extras
\$ 621	exames laboratoriais (extras)
<u>\$ 6.164</u>	

POR PACIENTE!!

Critérios

- Equipe da coleta treinada?
- Nº de amostras positivas
- Organismo Identificado - flora pele?
- Tempo de incubação - acima de 72h, geralmente sugere contaminante – auto.
- Organismos diferentes - sítio primário da infecção e hemocultura
- **Conduta clínica** - antibioticoterapia

Interpretação das hemoculturas positivas

- Qualquer microrganismos pode causar bacteriemia
- 15 a 30% SCN – causa da bacteriemia
- Hemocultura negativa não exclui bacteriemia
- Hemocultura positiva: nem sempre o microrganismo isolado é o agente causal
- O grande desafio é diferenciar “contaminante” do “verdadeiro patógeno”.

Metodologia adequada de coleta!

Exemplos de alguns indicadores da qualidade - hemocultura

Processo	Objetivo	Indicador	Análise crítica
Hemocultura	Solicitação médica adequada	Nº de hemoculturas solicitadas por requisição médica. Solicitação de apenas uma amostra* isolada ou > 3 amostras em 24h	Determinar a prevalência e a razão de coletas isoladas e excessivas. <u>Ação necessária:</u> contato com médico assistente
Hemocultura	Aderências às técnicas assépticas de coleta	% de contaminação Nº. de frascos com contaminados/ pelo número de total de frascos coletados x 100) Result. esperado ≤ 3% Algumas literaturas – 1 a 2%	Determinar o percentual de contaminação. <u>Ação necessária:</u> rever procedimento e treinamento da equipe envolvida na coleta
• Uma amostra é definida como uma punção venosa fracionada em dois frascos			

Como melhorar os diagnósticos das hemoculturas Concluindo...

- A hemocultura é “O” exame mais importante no Lab de microbiologia
- O **pré-analítico**, sobretudo a coleta, interfere diretamente no exame
- **Volume e anti-sepsia** : fazem a diferença melhorando a positividade e confiabilidade no resultado
- **Equipe de coleta treinada e comprometida**
- **Indicadores de qualidade** monitorados
- A diferenciação entre patógenos e contaminantes não é simples e necessita de um trabalho em conjunto entre o **laboratório e o corpo clínico**.

Escarro

- Participação ativa do paciente.
- Supervisão direta do pessoal da enfermagem ou clínico.
- Lavado brônquico --- resultados mais confiáveis x secreção traqueal.
- Amostra deve ser purulenta e não salivar.
- Suspeita infecção por micobactéria ou fungo --- 3 amostras, em dias consecutivos (1 amostra/dia).

Trato respiratório

- Bacterioscópico de escarro
- O aproveitamento do resultado é controverso
- Experiência do profissional
 - subjetividade
- Evitar resultados descritivos (“em catálogo”)
- Valorizar resultados interpretativos
- Alguns morfotipos são bastante característicos
- Diversos agentes de infecções respiratórias não são caracterizados em exame bacterioscópico

Culturas de secreções

- Termo "secreção de ferida" é inapropriado -- descrever o sítio anatômico da amostra.
- Ferida: superficial, profunda ou sítio cirúrgico.
- Ferida superficial --- ~~anaeróbio~~.
- **IMPORTANTE:** anti-sepsia da pele ou lesão.
- Anaeróbio --- aspirado X ~~swab~~.
- Amostra de ferida superficial coletada com swab – análise crítica do resultado – correlacionar Gram x Cultura

"Swab" menos recomendado

- material ⇒ facilmente contaminado com a flora endógena
- nas culturas para anaeróbios ⇒ exposição ao oxigênio
- sujeito a ressecamento
- quantidade relativamente pequena de material
- menos satisfatórios que os aspirados para preparação de esfregaços e análise macroscópica

Resultado emitido pelo Lab Cultura de ISC

1. *S. aureus*: poucas colônias
MRSA, VC (S)
2. *Enterococcus faecalis*: poucas colônias
Amp (S), Aminog HL (S)
3. *P. aeruginosa*: poucas colônias
MultiR, Mero (S)
4. *K. pneumoniae*: raras colônias
ESBL +

Amostras que devem ser desencorajadas - resultados questionáveis

- Ponta de cateter em meio de transporte
- Swab seco de secreção superficial
- Fragmento de biópsias em formol - cultura
- Urina contaminada com fezes
- Escarro de 24h
- Ponta de cateter de Foley

não processar!

*Amostras que devem ser desencorajadas
- resultados questionáveis*

Swab de amostra de queimadura, de lesão
de gangrena e de úlcera de decúbito

*Não processar!
Sugerir biópsia ou aspirado*

*Investimento na fase pré-analítica –
resultados confiáveis*

Tecido > Aspirado > Swab

Swab: ↓ volume ↑ contaminação

Fácil dizer - difícil é fazer acontecer!

Urocultura - Interpretação do crescimento

CC (UFC/mL)	Dados/paciente/ tipo coleta	Microrganismo	Processamento
0		nenhum	nenhum
10 ²	punção suprapúbica	todos	ID + ANT
10 ² - 10 ⁴	mulher / sintomática	1 PP	ID + ANT
10 ⁴	urina cateter	2 PP	ID + NA
		3 ou +	----
		Nota ou nova amostra?	
≥ 10 ⁵	urina jato médio	1 PP	ID + ANT
	UJM + sintoma	2 PP	ID + ANT
	urina jato médio	3 ou +	---
		Nota ou nova amostra?	

O que fazer?

- Paciente do sexo feminino, 75 anos de idade
- Leucócitos: 270.000/mL
- Eritrócitos: 56.000/mL
- Cultura: acima de 100.000/UFC/mL de *E. coli*, *Candida* spp. e *Enterococcus* spp.

Pontos importantes na interpretação dos resultados

- Verificar identificação do agente
- Quantificação (UFC/mL)
- Isolado único ?
- Avaliar sedimento urinário (celularidade)
- Gram em algumas situações
- Informações gerais do paciente
- Exames correlatos e anteriores

Guia para rotina microbiológica - cultura

1. Cultura mista: rotina limitada de identificação e TSA
2. ID e TSA somente dos microrganismos considerados patogênicos para o material analisado
3. Não valorize (ID + TSA) um microrganismo presente em amostras não representativas do processo infeccioso.
4. Questione a identificação de leveduras de amostras trato respiratório inferior – escarro
5. Reporte o que você sabe mesmo se você não estiver 100% certo: sugestivo de...troque idéia com o clínico.

Obrigada!

cassia@sluzia.com.br

Florianópolis 2006

