

| | | | |
|---------------------|--|----------------------------|--------------------------------|
| Tipo do Documento | PROCEDIMENTO / ROTINA | POP.UACAP.005 – Página 1/5 | |
| Título do Documento | MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS | Emissão: 04/09/2025 | Próxima revisão: 04/09/2027 |
| | | Versão: 03 | |

1. OBJETIVO

- Descrever a técnica empregada na UACAP para identificar bactérias isoladas de amostras clínicas.

2. MATERIAL

- Painéis Phoenix de ID (identificação) e de TSA (antibiograma);
- Caldo Phoenix ID;
- Caldo Phoenix TSA;
- Solução indicadora Phoenix TSA;
- Estação de inoculação;
- Salina estéril;
- Lâmina de microscopia;
- Coloração de GRAM;
- Alça bacteriológica estéril;
- BD Phoenix System (fabricado por Becton Dickinson and Company - Registro Anvisa: 10033430436);
- BD PhoenixSpec Nephelometer (fabricado por Becton Dickinson and Company).

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

3.1. Identificação prévia através do meio de cultura

- Ágar sangue (AS) – meio rico e não seletivo, diferencial para a hemólise, nele crescem a maioria dos Gram-negativos e Gram-positivos, além de fungos filamentosos (bolors) e leveduras. A hemólise pode ser classificada em hemólise beta (lise completa), hemólise alfa (lise parcial) e hemólise gama (sem lise).
- Ágar chocolate (AC) – meio rico e não seletivo, permite o crescimento da grande maioria das bactérias aeróbias e facultativas. Quando incubado em CO₂ dá suporte também ao crescimento dos microaerófilos. Podem-se observar halos esverdeados com colônias alfa-hemolíticas.
- Ágar Cistina-Lactose-Eletrolito-Deficiente (CLED) – meio de cultura para o isolamento e

| | | | |
|---------------------|--|----------------------------|-----------------------------|
| Tipo do Documento | PROCEDIMENTO / ROTINA | POP.UACAP.005 – Página 2/5 | |
| Título do Documento | MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS | Emissão: 04/09/2025 | Próxima revisão: 04/09/2027 |
| | | Versão: 03 | |

identificação de bactérias urinárias. Ele é projetado para distinguir entre bactérias coliformes e não-coliformes em amostras de urina, promovendo o crescimento de patógenos urinários e reduzindo a formação de swarming de espécies de *Proteus spp.*.

- Ágar MacConkey (MC) – meio seletivo para Gram-negativos e diferencial para a utilização de lactose. Lactose positiva – coloração rosa-avermelhada; Lactose negativa – coloração inalterada. Deve inibir o crescimento de micro-organismos Gram-positivos. Como exceção, eventualmente, podem crescer *Enterococcus spp.*, *Candida spp.* e *Bacillus spp.*.
- Ágar Salmonela-Shigella (SS) – meio seletivo para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* e diferencial para a utilização de lactose (coloração rósea) e produção de H₂S (coloração negra).

3.2. Identificação através da coloração de GRAM

- 1º Realizar a coloração de Gram para todas as colônias crescidas em meios não seletivos quando o aspecto deixar dúvidas quanto à sua classificação;
- 2º Identificar uma lâmina de vidro com o número do paciente e o tipo de amostra, e pingar uma gota de salina estéril;
- 3º Pegar pequena porção de uma colônia com o auxílio de alça estéril, e depositar sobre a gota de salina da lâmina;
- 4º Homogeneizar o material com movimentos circulares;
- 5º Aguardar para que seque e fixar a lâmina sobre a chama;
- 6º Prosseguir com a coloração de GRAM descrita no POP de preparo de lâminas para bacterioscopia (POP nº 017 da UACAP).

3.3. Identificação e antibiograma através da inoculação em painéis para automação

O método de inoculação dos painéis deve ser aplicado a todas as amostras.

3.3.1. Preparo do painel

- 1º Remover o painel da embalagem cuidadosamente tocando somente as laterais do painel;
- 2º Colocar o painel na estação de inoculação com as duas aberturas para cima;
 - **OBS:** O painel deve ser inoculado em até **2 horas** após a remoção da embalagem;
- 3º Identificar o painel em cima da etiqueta azul.

| | | | |
|---------------------|---|----------------------------|-----------------------------|
| Tipo do Documento | PROCEDIMENTO / ROTINA | POP.UACAP.005 – Página 3/5 | |
| Título do Documento | MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS | Emissão: 04/09/2025 | Próxima revisão: 04/09/2027 |
| | | Versão: 03 | |

3.3.2. Preparo do inóculo

- 1º Identificar o tubo ID como o número de acesso e o número do isolado;
 - 2º Usar técnicas assépticas e pinçar colônias de mesma morfologia e isoladas com alça estéril e ressuspender no tubo de identificação;
 - 3º Fechar o tubo e homogeneizar com auxílio do vórtex;
 - 4º Esperar 10 segundos para as bolhas de ar subirem até a superfície do líquido;
 - 5º Usar o Nefelômetro para medir a turbidimetria (0,50 – 0,60). Em casos de difícil turvação, realize o preparo do inóculo com turbidez de 0,20 – 0,30. Essa suspensão com o inóculo deve ser usada, no máximo, **60 minutos** após o preparo;
- **OBS:** O Nefelômetro deve ser calibrado trimestralmente no BD Phoenix Nephelometer e/ou conforme indicação do fabricante (vide manual). E a leitura diária no nefelômetro deve ser realizada utilizando-se as quatro soluções fornecidas pelo fabricante.

3.3.3. Preparo do inóculo padrão para antibiograma (TSA)

- 1º Identificar o tubo TSA com o número de acesso e o número do isolado;
 - 2º Adicionar uma gota em queda livre do indicador TSA no tubo, que deve estar à temperatura ambiente antes de ser usado;
 - 3º Homogeneizar por inversão manualmente;
 - 4º Transferir 25 uL da suspensão pronta do tubo ID para o tubo TSA;
 - 5º Homogeneizar por inversão manualmente;
- **OBS:** no caso de preparo da suspensão ID com turvação de 0,20 – 0,30, deve-se transferir 50 uL da suspensão pronta do tubo ID para o tubo TSA. A suspensão do tubo TSA precisa ser inoculada no painel em até **30 minutos** após o preparo.

3.3.4. Inoculação das suspensões ID e TSA no painel

- 1º Colocar os tubos ID e TSA na estação de inoculação e verter cada caldo em sua respectiva cavidade de cada painel (ID à esquerda e TSA à direita);
 - 2º Selar as cavidades após o completo preenchimento dos poços com as tampas plásticas em cada lado;
- **OBS:** Os painéis devem ser introduzidos no Phoenix em até **30 minutos** após serem inoculados e selados;
- 3º Colocar os painéis na vertical na rack de transporte.

| | | | |
|---------------------|---|----------------------------|-----------------------------|
| Tipo do Documento | PROCEDIMENTO / ROTINA | POP.UACAP.005 – Página 4/5 | |
| Título do Documento | MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS | Emissão: 04/09/2025 | Próxima revisão: 04/09/2027 |
| | | Versão: 03 | |

3.3.5. Inserção dos painéis do Phoenix

- 1º Inserir a identificação do paciente e número de acesso na tela de registro da amostra/entrada rápida do equipamento Phoenix;
- 2º Clicar no ícone de códigos de barra na grade de testes disponíveis e realizar a leitura do código de barras do painel;
- 3º Salvar e inserir o painel no Phoenix.

3.3.6. Leitura

A identificação e o antibiograma são realizados pelo BD Phoenix e a leitura é realizada através do sistema Epicenter, conforme *guide line* definida pela ANVISA.

3.4. Controle da qualidade

- **Controle da qualidade interno:**

- 1º Realizar mensalmente ou a cada troca de lote dos painéis de ID e TSA;
- 2º Utilizar como CQ as ATCC: *E. faecalis* 29212 e 51299, *S. aureus* 25923, *P. aeruginosa* 27853 e *E. coli* 25922 e 35218;
- 3º Inserir os painéis de ID/TSA de CQ no BD Phoenix através do registro de controle de qualidade.

- **Controle de qualidade externo:** vide POP de controle externo de qualidade (*POP. nº 054 da UACAP*).

4. REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à saúde. Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame a análise microbiológica e laudo final.** Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à saúde. Módulo 6 – Detecção e Identificação de Bactérias.** Brasília: Anvisa, 2013.

BD. **Manual do Sistema de Microbiologia Automatizada BD Phoenix M50.** New Jersey, EUA.

| | | | |
|---------------------|--|----------------------------|-----------------------------|
| Tipo do Documento | PROCEDIMENTO / ROTINA | POP.UACAP.005 – Página 5/5 | |
| Título do Documento | MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS | Emissão: 04/09/2025 | Próxima revisão: 04/09/2027 |
| | | Versão: 03 | |

5. HISTÓRICO DE REVISÃO

| VERSÃO | DATA | DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO |
|--------|------------|------------------------|
| 01 | 24/06/2021 | Elaboração do POP |
| 02 | 08/08/2023 | Revisão do POP |
| 03 | 10/06/2025 | Revisão do POP |

| | |
|--|--|
| Elaboração Letícia Cristina Limiere Janaina Narcizo Rodrigues | Data: 24/06/2021 |
| Revisão 2ª Versão: Janaina Narcizo Rodrigues Letícia Cristina Limiere 3ª Versão: Nathalie Gaebler Vasconcelos Janaina Narcizo Rodrigues | Data: 08/08/2023 Data: 10/06/2025 |
| Validação: Fuad Fayez Mahmoud – STGQ | Data: 29/08/2025 |
| Aprovação: Viviane Regina Noro – Chefe da UACAP Tiago Amador Correia - GAS | Data: 31/07/2025 Data: 04/09/2025 |

Assinado eletronicamente no processo SEI23529.011397/2023-14