

MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em
Laboratório de Microbiologia Clínica



**MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA
O CONTROLE DE INFECÇÃO
RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

Módulo 1: Biossegurança e Manutenção
de Equipamentos em Laboratório de
Microbiologia Clínica

Copyright © 2013 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

A Anvisa, igualmente, não se responsabiliza pelas idéias contidas nessa publicação.

1ª edição – 2010

Elaboração, distribuição e informações:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: www.anvisa.gov.br

Diretoria

Dirceu Brás Aparecido Barbano – Diretor-Presidente

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Redação:

Ana Lúcia Roscani Calusni – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Maria José Franco Landi Bartelega – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Paula Virginia Bottini – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Adjuntos de Diretor

Luiz Roberto Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araujo de Oliveira

Doriane Patricia Ferraz de Souza

Revisão técnica – Anvisa:

André Anderson Carvalho

Fabiana Cristina de Sousa

Heiko Thereza Santana

Magda Machado de Miranda

Suzie Marie Gomes

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

Cooperação técnica:

Termo de Cooperação Nº 64

Organização Pan-Americana da Saúde

Organização Mundial da Saúde

Representação Brasil

Joaquin Molina – Representante

Enrique Vazquez – Coordenador da Unidade Técnica de Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Rogério da Silva Lima – Consultor Nacional da Unidade Técnica de Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde – GVIMS

Magda Machado de Miranda Costa

Coordenação Técnica:

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos – Anvisa

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas-SP

Projeto Gráfico e Diagramação:

All Type Assessoria Editorial Ltda

Capa:

Camila Contarato Burns – Anvisa

Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2013.

44p.: il.9 volumes

ISBN

1. Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Título.

SUMÁRIO

Apresentação	5
---------------------------	----------

Capítulo 1: Segurança em laboratório de Microbiologia Clínica	7
--	----------

1.1	Biossegurança	7
1.2	Classificação dos laboratórios, segundo Nível de Biossegurança	8
1.2.1	Nível 1 de Biossegurança (NB-1)	8
1.2.2	Nível 2 de Biossegurança (NB-2)	8
1.2.3	Nível 3 de Biossegurança (NB-3)	9
1.2.4	Nível 4 de Biossegurança (NB-4)	9
1.3	Classes de agentes de Risco Biológico	10
1.4	Recomendações de Biossegurança	11
1.5	Instalações laboratoriais	12
1.6	Equipamentos de proteção	12
1.6.1	Equipamento de Proteção Individual (EPI)	12
1.6.2	Equipamento de Proteção Coletiva (EPC)	13
1.7	Conduta em laboratório	15
1.7.1	BPLCs	15
1.7.2	Transporte de Amostras	15
1.7.3	Utilização de Cabines de Segurança	15
1.7.4	Controle da Geração de Aerossóis	16
1.8	Limpeza e desinfecção	16
1.8.1	Higienização das mãos	17
1.9	Resíduos	18
1.10	Acidentes	19
1.10.1	Acidente com derramamento de Material Biológico	19
1.10.2	Quebra de tubos contendo Material Biológico em Centrífuga	19
1.10.3	Acidente com derramamento de Produtos Químicos	19
1.11	Referências Bibliográficas	20

Capítulo 2: Garantia da qualidade em Microbiologia	21
---	-----------

2.1	Introdução	21
2.2	Manual de procedimentos	22
2.3	Recursos humanos	23
2.4	Área física e instalações	23
2.5	Fase pré-analítica	24
2.5.1	Requisição	24
2.5.2	Coleta	24
2.5.3	Transporte e conservação	25
2.5.4	Critérios de rejeição	26

2.6	Fase analítica	26
2.6.1	Microbiologia geral	26
2.6.2	Bacteriologia	30
2.6.3	Procedimentos analíticos.....	37
2.6.4	Micobacteriologia	39
2.6.5	Micologia	40
2.6.6	Processos Automatizados	41
2.6.7	Testes de Proficiência	42
2.7	Fase pós-analítica	42
2.7.1	Conferência.....	42
2.7.2	Liberação dos laudos e notificação de resultados críticos.....	43
2.8	Referências Bibliográficas	43

APRESENTAÇÃO

A resistência microbiana é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência microbiana.

Nesse contexto, insere-se o Laboratório de Microbiologia, que tem como objetivo não apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas também indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos micro-organismos que estão interagindo com o organismo humano, possibilitando a indicação de tratamentos mais adequados. Para o desempenho satisfatório dessa função, é fundamental que os laboratórios de microbiologia possuam estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota e os contaminantes, identificar micro-organismos associados à infecção ou com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, realizar o transporte rápido das amostras e manter uma educação contínua em relação aos aspectos da infecção relacionada à assistência à saúde.

Tendo em vista esses aspectos e considerando que a microbiologia é um campo muito dinâmico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, em cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, propõe a terceira revisão do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, buscando atualizar informações nos temas considerados essenciais e contando com um seleto e conceituado corpo editorial. O manual é composto por nove módulos, a saber: Módulo 1 – Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica; Módulo 2 – Controle externo da qualidade; Módulo 3 – Principais Síndromes Infecciosas; Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final; Módulo 5 – Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos; Módulo 6 – Detecção e identificação de bactérias de importância médica; Módulo 7 – Detecção e identificação de micobactérias de importância médica; Módulo 8 – Detecção e identificação de fungos de importância médica e Módulo 9 – Infecções virais.

A Anvisa e a OPAS esperam com essa publicação contribuir para que os laboratórios de microbiologia possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada unidade hospitalar, além de subsidiar a adoção de procedimentos básicos padronizados nesses serviços.



Capítulo 1:

Segurança em laboratório de Microbiologia Clínica

Maria José Franco Landi Bartelega

Laboratórios são estabelecimentos que prestam serviços específicos à população e apresentam uma diversidade de atuações em saúde que expõem seus profissionais a grande variedade de agentes de riscos biológicos, químicos e físicos, associados aos materiais e métodos utilizados.

Visando minimizar tais riscos, é essencial o estabelecimento de um Programa de Biossegurança específico, que deverá dotar o laboratório de estrutura física, administrativa e técnica compatível com as atividades desenvolvidas, promovendo assim ações preventivas.

1.1 Biossegurança

Conjunto de medidas destinadas a prevenir riscos inerentes às atividades dos laboratórios de assistência, ensino, pesquisa e desenvolvimento tecnológico, que possam comprometer a saúde dos profissionais e o meio ambiente.

A responsabilidade legal pela segurança em ambientes de trabalho cabe aos administradores, no entanto os funcionários devem incorporar em sua rotina de trabalho as Boas Técnicas Microbiológicas e as Normas de Biossegurança. (NR-32 MTE)

Deve-se designar uma pessoa ou Comissão de Biossegurança que vise:

- Implementar as normas preconizadas em Biossegurança a fim de prevenir riscos para funcionários, alunos, pacientes e meio ambiente.
- Padronizar e normatizar procedimentos que regulamentem as normas de segurança.
- Identificar e classificar áreas de risco.

- Estabelecer programas de treinamento para prevenção de acidentes e monitorar acidentes de trabalho.

1.2 Classificação dos laboratórios, segundo Nível de Biossegurança

O nível de Biossegurança de um procedimento será determinado segundo o agente biológico de maior classe de risco envolvido. Quando não se conhece a patogenicidade do agente biológico deve-se realizar uma avaliação do risco para estimar o nível de contenção.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é responsável pelas atribuições relativas ao estabelecimento de normas, análise de risco, definição dos Níveis de Biossegurança e classificação de Organismos Geneticamente Modificados (OGM). As características físicas, estruturais e de contenção de um laboratório determinam o tipo de micro-organismo que pode ser manipulado em suas dependências.

1.2.1 Nível 1 de Biossegurança (NB-1)

- Adequado ao trabalho que envolva agente com menor grau de risco (Classe de Risco I) para profissionais do laboratório e para o meio ambiente.
- Aplicação das BPLs e utilização de EPIs.
- O trabalho geralmente é conduzido em bancadas abertas, não exigindo equipamentos especiais de contenção.
- Os profissionais deverão ter treinamento específico nos procedimentos realizados e trabalhar sob supervisão.
- O acesso ao laboratório será limitado ou restrito de acordo com definição do responsável e não será permitida a entrada de animais e crianças.
- Procedimentos técnicos e administrativos descritos.
- O laboratório não está separado das demais dependências do edifício.
- Deve possuir uma pia específica para lavar as mãos.

1.2.2 Nível 2 de Biossegurança (NB-2)

- Adequado ao trabalho que envolve agentes de risco moderado para os profissionais e para o meio ambiente, em geral agentes causadores de doenças infecciosas (Classe de Risco II).
- As instalações exigidas devem atender as especificações estabelecidas para o NB-1 acrescidas das seguintes exigências:
 - 1) autoclave disponível para descontaminação no interior ou próxima ao laboratório de modo a permitir a descontaminação de todo o material antes do seu descarte;

- 2) cabine de Segurança Biológica Classe I ou II e centrífuga com caçapa protegida sempre que houver manipulação de materiais em que possa existir a formação de aerossóis.
- Os profissionais deverão ter treinamento específico no manejo de agentes patogênicos, ser orientados sobre os possíveis riscos e trabalhar sob supervisão.
 - O acesso ao laboratório será limitado durante os procedimentos operacionais.

1.2.3 Nível 3 de Biossegurança (NB-3)

- Adequado ao trabalho com micro-organismos com elevado risco infeccioso (Classe de Risco III) podendo causar doenças sistêmicas sérias e potencialmente letais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetti* e *Brucella* spp., entre outros.
- Barreiras de proteção individual devem ser utilizadas e toda manipulação realizada em cabine de segurança biológica classe II ou III, com filtro HEPA.
- Oferecer treinamento específico aos funcionários no manejo de agentes patogênicos e potencialmente letais, orientar sobre os possíveis riscos e trabalhar sob supervisão.
- Quando não houver condições específicas para o NB-3 e instalações laboratoriais sem área de acesso específica, com ambientes selados ou fluxo de ar unidirecional, as atividades de rotina e operações repetitivas podem ser realizadas em laboratório com instalação NB-2, acrescidas de equipamentos de contenção e das práticas recomendadas para NB-3. Cabe ao pesquisador principal a decisão de implementar essas modificações, comunicando-as a CIBio e CTNBio (Biossegurança em Laboratório de Saúde Pública – Oda, Leila, Ávila, Suzana *et al.* Brasília).
- O acesso ao laboratório será controlado. Menores de idade não serão permitidos dentro do laboratório.

1.2.4 Nível 4 de Biossegurança (NB-4)

- Representa o nível máximo de segurança. Adequado ao manuseio de agentes infecciosos que possuem alto risco de infecção individual e de transmissão pelo ar e sempre que o trabalho envolver OGM resultante de organismo receptor ou parenteral classificado como classe de risco NB-4.
- Responsável técnico tem a responsabilidade final no controle do acesso ao laboratório.

1.3 Classes de agentes de Risco Biológico

Agentes biológicos humanos e animais são divididos em classes de acordo com critérios de patogenicidade: alteração genética ou recombinação gênica, estabilidade, virulência, modo de transmissão, endemicidade, consequências epidemiológicas, disponibilidade de medidas profiláticas e tratamento eficaz (Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico – Ministério da Saúde).

Classe de Risco I	Nenhum ou baixo risco individual e comunitário. Microrganismo que tenha pouca probabilidade de causar enfermidades humanas e em animais. Ex: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Classe de Risco II	Risco individual moderado e risco comunitário limitado. A exposição ao agente patogênico pode provocar doença humana ou animal, porém se dispõe de medidas eficazes de tratamento e prevenção, sendo o risco de propagação limitado. Ex: <i>Clostridium tetani</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Cândida albicans</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Plasmodium</i> etc.
Classe de Risco III	Risco individual elevado e risco comunitário limitado. A exposição pode causar doenças graves ao homem podendo propagar-se de uma pessoa infectada para outra, entretanto existe profilaxia e/ou tratamento. Ex: <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Brucella</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , vírus da Hepatite, HIV.
Classe de Risco IV	Elevado risco individual e comunitário. Os agentes patogênicos representam grande ameaça para as pessoas e animais, com fácil propagação de um indivíduo a outro, direta e indiretamente, não existindo profilaxia nem tratamento. Ex: vírus de febres hemorrágicas, vírus Ebola, certos arbovírus etc.
Classe de Risco V	Elevado risco de causar doença animal e disseminação no meio ambiente. Aplica-se a agentes de doença animal, não existente no País e que, embora não sejam patógenos de importância para o homem, podem gerar graves perdas econômicas. Os agentes devem ter sua importação proibida e manipulados em laboratório de contenção máxima NB-4.

1.4 Recomendações de Biossegurança

NB	Agentes	Práticas	Barreiras de Contenção e Equipamentos de segurança	Instalações
1	<ul style="list-style-type: none"> Pouca probabilidade de causar doenças em adultos saudáveis 	<ul style="list-style-type: none"> Boas Práticas Microbiológicas (BPLs) 	<ul style="list-style-type: none"> Equipamento de Proteção Individual (EPI) avental e luvas 	<ul style="list-style-type: none"> Bancada aberta e pia para a lavagem das mãos
2	<ul style="list-style-type: none"> Agentes associados a doenças Risco individual moderado e limitado para comunidade Vias de transmissão: lesão cutânea, ingestão, exposição de mucosa 	<p>NB-1 acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Acesso limitado Sinalização de risco Manual de biossegurança definindo políticas de vigilância médica e necessidade de descontaminação dos resíduos 	<ul style="list-style-type: none"> Barreiras Primárias: Cabine de Segurança Classe I ou II, usada para manipulação de todos materiais que possam formar aerossol ou que haja risco de respingo. EPI: avental, luvas e protetor facial quando necessário 	<p>NB-1 acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Autoclave disponível
3	<ul style="list-style-type: none"> Agentes que provocam infecções graves ou potencialmente letais. Risco individual alto e limitado para comunidade. Transmissão potencial por formação de aerossóis 	<p>NB-2 acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Acesso controlado Descontaminação de todo resíduo Descontaminação do avental antes da lavagem Banco de soro de funcionários na admissão 	<ul style="list-style-type: none"> Barreiras Primárias: Cabine de Segurança Classe I ou II, usada para manipulação de todos os materiais EPI: avental, luvas, máscaras quando necessário 	<p>NB-2 acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Separação física de corredor de acesso Porta com fechamento automático, dupla porta de acesso Ar não recirculado Pressão negativa no laboratório
4	<ul style="list-style-type: none"> Agentes com alto risco de causar doença letal Risco individual e para comunidade elevado Ocorrências de infecções causadas por transmissão por aerossóis ou risco de transmissão desconhecido 	<p>NB-3 acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Trocar de roupa antes de entrar no laboratório Tomar banho na saída Todo material deve ser descontaminado antes de sair do laboratório 	<ul style="list-style-type: none"> Barreiras Primárias: Manipulações conduzidas em cabine de Segurança Classe II B ou Classe III 	<p>NB-3 acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> Construção separada ou área isolada Sistema de exaustão Fornecimento de ar e vácuo Descontaminação

1.5 Instalações laboratoriais

NB	Instalações
1	Fácil limpeza e descontaminação. <ul style="list-style-type: none"> • Superfície das bancadas impermeável e resistente a ácidos, álcalis, solventes e calor. • Espaço entre bancadas e equipamentos que permita a limpeza. • Pia para lavagem das mãos.
2	NB-1 acrescida de: <ul style="list-style-type: none"> • Autoclave para descontaminação (dentro ou próximo).
3	NB-2 acrescido de: <ul style="list-style-type: none"> • Separado de áreas de trânsito. • Sistema de dupla porta. • Superfícies internas, pisos e tetos resistentes a água. • Portas com fechamento automático. • Sistema de ar independente, ventilação unidirecional, sem recirculação de ar e filtrado com filtro HEPA para eliminação. • Linhas de vácuo protegidas por sifão contendo desinfetante e filtro HEPA ou semelhantes.
4	NB-3 acrescido de: <ul style="list-style-type: none"> • Câmara de entrada e saída de pessoal separada por chuveiro. • Sistema de autoclave de dupla porta, câmara de fumigação. • Paredes, tetos e pisos construídos com sistema de vedação interna. • Sistema coletor de descontaminação de líquidos. • O ar deve ser insuflado através de filtros HEPA e eliminado para o exterior através de dutos de exaustão.

OBS: As instalações deverão ser verificadas uma vez por ano e filtros substituídos quando necessário.

1.6 Equipamentos de proteção

Considera-se Equipamento de Proteção Individual (EPI) todo dispositivo ou produto, de uso individual utilizado pelo trabalhador, destinado à proteção de riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho (NR 6 MTE). É regulamentado pela Portaria 485, de 11 de novembro de 2005, que aprova a NR 32 (Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde) do Ministério do Trabalho, competindo ao profissional usá-los e conservá-los.

1.6.1 Equipamento de Proteção Individual (EPI)

- **Avental:** uso para todos que trabalham em ambiente laboratorial, confeccionado em algodão, com manga longa e punho sanfonado, na altura dos joelhos e usado abotoado. Não usar fora da área de trabalho, nem guardar junto com objetos pessoais. Para laboratórios NB-3, recomenda-se que o abotoamento do avental seja nas costas. Há necessidade de descontaminação antes da lavagem. Apesar do avental de algodão não ser considerado EPI por não ter nº de CA, seu uso deve ser obrigatório.
- **Avental Impermeável:** evita a contaminação do vestuário.

- **Luvas:** uso para todos que trabalham em ambiente laboratorial, na manipulação de amostras biológicas, preparo de reagentes, lavagem de materiais, atendimento ao paciente. Descartar sempre que estiverem contaminadas ou quando sua integridade estiver comprometida.
 - **Nitrilica:** usadas em trabalhos gerais, preparo de soluções, lavagem de materiais.
 - **De latex ou silicone descartável:** usadas em procedimentos que necessitem de proteção contra material biológico. Devem ser desprezadas após uso.
- **Kevlar:** usadas para trabalhar em baixas ou altas temperaturas (autoclaves e estufas e freezer a $- 80^{\circ}$).
- **Máscaras e Respiradores:** proteção de boca e nariz contra respingos e inalação de partículas em aerossol e substâncias químicas voláteis e tóxicas.
 - **Máscara N-95:** composta de 4 camadas de fibras sintéticas impermeáveis a fluídos, com densidade e porosidade capazes de atuar como barreira a micro-organismos transportado pelo ar (aerossóis) com eficiência de filtração maior ou igual a 95%/ partículas de 0,3 μ .
 - **Respirador PFF2 + VO:** usado quando da manipulação de reagentes químicos voláteis.
- **Óculos de Proteção:** destinado à proteção dos olhos contra respingos de material biológico, substâncias químicas e partículas.
- **Protetor Facial:** destinado à proteção da face contra respingos de material biológico, substâncias químicas e partículas. Deve ser leve, resistente, com visor em acrílico.
- **Sapatos:** devem ser fechados, evitando-se assim impactos e respingos.

1.6.2 Equipamento de Proteção Coletiva (EPC)

- **Cabine de Segurança Biológica:** é o principal equipamento de contenção física para agentes infecciosos. Protegem o material e o profissional, na manipulação de materiais biológicos altamente infectantes, substâncias tóxicas e cultura de células. Cumprir os prazos de revisão e troca de filtros. As cabines devem estar em local de pouco trânsito e distantes de portas. Existem três tipos de cabine de segurança biológica (Classes I, II e III).
 - **Classe I:** é uma cabine em que o fluxo de ar ocorre de fora para dentro, pela abertura frontal, sem recirculação do ar. O ar da cabine passa por um filtro HEPA antes de ser liberado para o interior do laboratório. Essas cabines protegem o operador, mas não o material que está sendo manipulado e podem ser usadas quando se está trabalhando com micro-organismos de baixo ou moderado risco.

- *Classe II:* é uma cabine com abertura frontal na qual uma parte do ar é recirculado. Esse tipo de cabine protege o operador, o material a ser manipulado e o meio ambiente. Existem dois tipos de cabine classe II:
 - 1) Classe II A: 30% de ar ambiente entra pela abertura frontal, 70% é recirculado para o interior da cabine passando por um filtro HEPA e 30% é exaurido para dentro ou fora do laboratório passando por filtro HEPA. Usadas na ausência de substâncias químicas voláteis, radioativas ou tóxicas.
 - 2) Classe II B: 70% de ar ambiente entra pela abertura frontal, 30% é recirculado para o interior da cabine passando por um filtro HEPA e 70% é exaurido para fora do laboratório através de outro filtro HEPA, por um sistema de exaustão. São indicadas para manipulação de cultura de micobactérias e com algumas substâncias tóxicas, voláteis e/ou radioativas.
- *Classe III:* é uma cabine hermeticamente fechada, impermeável a gases, e todo o trabalho é realizado com luvas de borracha que estão presas à câmara. O ar que entra passa por um filtro HEPA e o ar que sai pelo exaustor passa por dois filtros HEPA dispostos sequencialmente. Todos os equipamentos necessários (centrífuga, incubadora etc.) devem estar dentro da cabine. É indicada para o trabalho com micro-organismos de alto poder infectante. Oferece o mais alto grau de proteção ao operador e ao meio ambiente.
- **Lava-olhos:** usado quando ocorrem acidentes onde haja contato de material biológico ou substância química, com os olhos e/ou a face. Os profissionais devem estar treinados quanto ao seu uso e as orientações localizadas próximas ao equipamento. Manter o acesso facilitado.
- **Chuveiro de Segurança:** usados quando ocorrem acidentes com derramamento de grande quantidade de material biológico ou substância química sobre as roupas e pele do profissional, ou quando as roupas estiverem em chamas. Os profissionais devem ser treinados quanto ao seu uso e as orientações localizadas próximas ao equipamento. Manter o acesso facilitado.
- **Proteção de Linha de Vácuo:** evita contaminação do sistema de vácuo com aerossóis e fluidos derramados.
- **Autoclave:** esterilização por calor eficaz, tornando material infeccioso seguro para ser eliminado ou reutilizado.
- **Garrafas com Tampa de Rosca:** produz confinamento eficaz contra aerossóis e derrames.
- **Microincineradores de alça:** à gás ou eletricidade têm escudo de vidro ou cerâmica que minimizam salpicos ou borrifos quando se esterilizam as alças.

1.7 Conduta em laboratório

O diretor e/ou coordenador do laboratório é responsável por assegurar a implementação das Normas de Biossegurança e as Condutas em Laboratório.

- Programa de Prevenção de Risco Ambiental (PPRA) avaliado anualmente (NR-32 Ministério do Trabalho).
- Exame pré-admissional e periódico (Clínico e Laboratorial) – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) anual.
- Programa de Vacinação atualizado.
- Registro de doenças e acidentes de trabalho.
- BPLCs (Boas Práticas em Laboratório Clínico) implantadas e seguidas.
- Acesso limitado ao laboratório.

1.7.1 BPLCs

- Proibido comer, beber, fumar, guardar alimentos e aplicar cosméticos na área técnica.
- Prender os cabelos e evitar o uso de bijuterias.
- É vedado o uso de calçados abertos (chinelos e sandálias).
- Toda amostra biológica deve ser considerada potencialmente contaminada.
- Obrigatório o uso de EPIs.
- Proibido pipetar com a boca.
- Obrigatória a descontaminação das bancadas de trabalho antes e após o desenvolvimento das atividades.
- Proibido reencapar e entortar agulhas após o uso.
- Nunca manipular materiais não identificados.
- Segregar e acondicionar adequadamente resíduos biológicos, químicos e ionizantes.
- Depositar todo material contaminado em recipientes apropriados para autoclavagem.
- Higienizar sempre as mãos.

1.7.2 Transporte de Amostras

- Utilizar caixas rígidas preferencialmente providas de tampas higienizáveis, contendo estantes que permitam que os frascos permaneçam na posição vertical, evitando acidente por derramamento. Devem ser resistentes a desinfetante químico ou calor. Devem ser lavadas frequentemente e sempre que ocorrer derramamento.

1.7.3 Utilização de Cabines de Segurança

- Ligar a cabine e a luz 10 a 15 minutos antes do uso.

- Fechar as portas do laboratório e evitar circulação de pessoas durante o uso da cabine.
- Colocar os equipamentos, meios de cultura, vidrarias etc. no plano de atividade da área de trabalho.
- Limpar todos os objetos antes de introduzi-los na cabine e organizar os materiais de modo que não se misturem os itens limpos e contaminados.
- Bicos de Bunsen não devem ser utilizados dentro da cabine, pois o calor pode acarretar danos ao filtro HEPA e interromper o fluxo laminar de ar, causando turbulência.
- Usar pipetador automático.
- Conduzir as manipulações no centro da cabine.
- Minimizar os movimentos dentro da cabine.
- Terminado o trabalho, a superfície de trabalho da cabine deve ser limpa com desinfetante apropriado.
- Deixar a cabine ligada 10 a 15 minutos antes de desligá-la.
- Fazer controle da contagem de tempo do uso das lâmpadas UV, e de utilização da cabine para fim de manutenção e troca do pré-filtro.

1.7.4 Controle da Geração de Aerossóis

A manipulação de micro-organismos, sangue, fluídos orgânicos, pó e substâncias químicas poderá levar à formação de aerossóis, podendo contribuir para ocorrência de enfermidades ocupacionais. Algumas operações contribuem para formação de aerossóis.

- Uso de agitadores.
- Remoção de tampas de borracha, de rosca ou de algodão de tubos de ensaio.
- Flambagem de alças de maneira inadequada.
- Inoculação de culturas com pipeta ou alça de forma inadequada.
- Remoção de meio de cultura líquido com seringa e agulha.
- Destampar frasco de cultivo ou suspensão de líquidos imediatamente após agitá-lo.
- Romper células com ultrassom.
- Soprar a última gota de cultivo ou substância química de uma pipeta.
- Não vedar adequadamente frascos de substâncias tóxicas voláteis.

1.8 Limpeza e desinfecção

As superfícies contaminadas podem servir como reservatório de agentes patogênicos, mas normalmente não são associadas diretamente à transmissão de infecções para Profissionais da Área da Saúde ou pacientes. Mesmo diminuindo o impacto des-

sa transmissão através da higienização das mãos, a realização da limpeza e desinfecção das superfícies é fundamental para a redução da incidência de infecções.

Os fatores que influenciam na escolha do procedimento de desinfecção das superfícies são: a) natureza do item a ser desinfetado; b) número de micro-organismos presentes; c) resistência do micro-organismo aos efeitos do germicida; d) quantidade de matéria orgânica presente; e) tipo e concentração do germicida usado; f) duração e temperatura do contato com o germicida; g) as especificações e indicações de uso do produto pelo fabricante.

Eficiência dos agentes químicos frente aos tipos comuns de micro-organismos

Desinfetante	Bactéria gram (+)	Bactéria gram (-)	Bacilo Tuberculose	Esporo	Vírus	Fungo
Sabão	0	0	0	0	0	0
Detergente	2	1	0	0	0	0
Quaternário de amônia	3	2	0	0	2	2
Cloro	3	3	0	0	2	2
Comp. Fenólicos	3	3	0	0	2	2
Hexaclorofeno	3	1	0	0	2	2
Álcoois	3	3	3	0	2	2
Glutaraldeído	3	3	3	2	3	3

Níveis: 3 = Bom 2 = Satisfatório 1 = Insatisfatório 0 = Não ativo

Fonte: Segurança no Ambiente Hospitalar, Ministério da Saúde

1.8.1 Higienização das mãos

Mãos contaminadas podem ser as principais vias de transmissão de infecção. O simples ato de lavar as mãos com água e sabão líquido, visando a remoção de bactérias transitórias e algumas residentes, como também células descamativas, pelos, suor, sujidades e oleosidade da pele, contribui para a diminuição do risco de infecção.

- Abrir a torneira e molhar as mãos sem encostar-se à pia.
- Ensaboar as mãos com sabão líquido. Friccionar as mãos por cerca de 30 segundos, realizando todos os movimentos a seguir:
 - a) fricção circularmente palma com palma;
 - b) fricção circularmente dorso com palma;
 - c) lavar os espaços interdigitais deslizando uma mão sobre a outra;
 - d) fricção as articulações de uma mão sobre a palma da outra;
 - e) lave o polegar com auxílio da outra mão;

- f) fricção circularmente as unhas (pontas dos dedos) na palma da outra mão;
- g) friccionar os pulsos com a palma da mão.
- Enxaguar as mãos retirando todo o resíduo de sabão.
- Enxugar as mãos com papel toalha e fechar a torneira utilizando o mesmo papel (se a torneira não for com acionamento automático). Torneiras manuais devem ser mantidas abertas até o término da lavagem das mãos.

1.9 Resíduos

O laboratório é responsável pelo correto gerenciamento de todos os resíduos gerados, atendendo as normas e exigências legais, desde o momento de sua geração até seu destino final.

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), segundo a RDC nº 306 de 2004 da Anvisa, são classificados em cinco grupos, a saber:

- Grupo A: resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção.
- Grupo B: resíduos contendo substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade.
- Grupo C: quaisquer materiais resultantes de atividades que contenham radionuclídeos em quantidades superiores ao nível de isenção estabelecida pelas normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).
- Grupo D: resíduos que não apresentam risco biológico químico ou radiológico podendo ser equiparado a resíduo doméstico, passível de segregação para reciclagem.
- Grupo E: materiais perfurocortantes ou escarificantes.

Num laboratório de Microbiologia, todos os resíduos gerados como culturas e estoques de micro-organismo, meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas, amostras biológicas, devem ser acondicionados de maneira compatível com o processo de tratamento a ser utilizado, que poderá ser um processo físico ou outro que venha a ser validado para obtenção de redução ou eliminação da carga microbiana.

Se o processo utilizado não promover a descaracterização física das estruturas, o mesmo deverá ser acondicionado em saco branco leitoso com simbologia de substância infectante conforme NBR 7500 da ABNT que será substituído sempre que atingirem 2/3 de sua capacidade ou pelo menos uma vez ao dia.

Havendo descaracterização física das estruturas, podem ser acondicionados como resíduos do Grupo D.

Materiais perfurocortantes devem ser descartados em recipientes rígidos, resistentes à punctura, ruptura e vazamento, devidamente identificados e autoclavados antes do descarte.

Os instrumentos de trabalho a serem reutilizados deverão ser colocados em recipientes preferencialmente plásticos contendo solução desinfetante e permanecer o tempo estabelecido pelo fabricante para posterior autoclavagem, lavagem e reutilização.

1.10 Acidentes

1.10.1 Acidente com derramamento de Material Biológico

- Isolar a área atingida.
- Impedir a manipulação no local por pelo menos 30 minutos.
- Usar EPIs.
- Colocar papel toalha sobre o material derramado e sobre o mesmo, solução de hipoclorito de sódio a 2%, ou cloro ativo, aguardar 15 minutos.
- Recolher em recipiente com saco para resíduo infectante ou saco autoclavável as toalhas de papel, luvas e todo material usado na descontaminação.
- Estilhaços de vidro ou plástico deverão ser recolhidos em caixa de perfurocortante.
- Refazer a descontaminação da área com solução de hipoclorito de sódio a 2%.

1.10.2 Quebra de tubos contendo Material Biológico em Centrífuga

- Desligar a centrífuga e manter fechada por 30 minutos para dispersão de aerossóis:
- Usar EPIs.
- Retirar estilhaços com auxílio de pinça e descartar em caixa de perfurocortante.
- Limpar caçapas, pinos e rotor com solução de hipoclorito de sódio a 2%.
- Limpar internamente a centrífuga com gaze embebida com solução de hipoclorito de sódio a 2% e após com pano embebido em água e sabão.
- Descartar todo o material usado na descontaminação em recipiente com saco para resíduo infectante.

1.10.3 Acidente com derramamento de Produtos Químicos

- Utilizar EPIs.

- Conter o líquido derramado em área reduzida.
- Cobrir o resíduo com vermiculina ou areia e aguardar sua absorção.
- Recolher todo o resíduo e o material utilizado para limpar a área em saco plástico preto para posterior descarte.

1.11 Referências Bibliográficas

Isenberg, HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.

ABNT. Biossegurança no Laboratório Clínico. Normas Brasileiras. CTN Bio.

Fleming, D, Richardson, JH, Tulis, JJ, Wesley, D. Laboratory Safety – Principles and Practices. ASM Press, USA 2º ed., 1995.

Oda, LM. Capacity Building – Programer on Biosafety – A guide to supervisors, RJ – 1998.

Oda, LM, Ávila, SM. Biossegurança em Laboratório de Saúde Pública. Ministério da Saúde, 1998.

Teixeira, P, Valle, S. Biossegurança – Uma Abordagem Multidisciplinar. FIOCRUZ Rio de Janeiro, 1996.

Oplustil, CP, Zoccoli, CM, Tabouti, NR, Sinto, IS. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.

U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition.

Organização Mundial Da Saude (OMS). Manual de Segurança Biológica em Laboratório, 3º edição.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar. 1991.

Brasil. Ministério do Trabalho. Portaria nº 458, de 11 de novembro de 2005. Norma Regulamentadora nº 32. Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Regulamento Técnico para Gerenciamento de Resíduos de Saúde.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conama. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Tratamento e Disposição Final dos Resíduos dos Serviços de Saúde.

Capítulo 2:

Garantia da qualidade em Microbiologia

*Ana Lucia Roscani Calusni
Paula Virginia Bottini*

2.1 Introdução

Um Serviço de Microbiologia pode compreender diversos setores, dependendo da forma de estruturação da área. De maneira geral podemos subdividir a microbiologia em Microbiologia Geral, Bacteriologia, Micobacteriologia, Micologia além de Virologia e Parasitologia, sendo que os dois últimos habitualmente constituem serviços separados na maioria dos laboratórios clínicos.

O laboratório clínico de Microbiologia é responsável por providenciar informação precisa e relevante quanto ao diagnóstico do paciente. O valor e a precisão clínica das análises do material clínico e o respectivo isolamento do(s) micro-organismo(s) são dependentes do programa de qualidade que, por sua vez, avalia a qualidade do material, documenta a validade do método aplicado, monitora a performance dos procedimentos, reagentes, meios, instrumentos e do indivíduo que executou a análise e verifica os resultados do teste quanto aos erros e relevância clínica. Um programa de qualidade efetivo depende de um processo de avaliação contínuo e do seu constante aprimoramento.

Os principais erros em Microbiologia incluem tipo de amostra inadequada para o exame a ser realizado, frascos de coleta não estéreis, o não uso de meios de transporte adequados, demora no transporte, uso de meios de cultura não apropriados, informação incorreta dos achados, desconsiderar um achado na análise, desconhecimento do papel dos interferentes e não analisar todos os achados em conjunto.

2.2 Manual de procedimentos

Todos os laboratórios devem possuir um manual de procedimentos atualizado e disponível na área de trabalho. Esses procedimentos operacionais (POPs) têm o objetivo de padronizar e minimizar a ocorrência de desvios na execução de tarefas fundamentais para a qualidade do exame, independentemente de quem as faça. Assim, garante-se que sejam tomadas as ações na fase pré-analítica, analítica e pós-analítica para assegurar que a qualidade de seus exames seja a mesma, de uma rodada para a outra, de um turno para outro, de um dia para outro, aumentando-se a previsibilidade de seus resultados e minimizando as variações causadas por imperícia e adaptações aleatórias da metodologia.

Todos os POPs do laboratório contêm, no mínimo, as seguintes informações:

- Nome do laboratório
- Título
- Identificação, assinatura e data da elaboração, revisão e aprovação do POP
- Número da versão atual
- Número do documento
- Abrangência e distribuição
- Número de cópias
- Princípio do teste
- Aplicação clínica
- Amostra analisada (tipo de amostra e suas condições necessárias)
- Padrões, controles, reativos e outros insumos
- Equipamentos (uso, calibração e manutenção preventiva)
- Passo a passo do ensaio (fase analítica detalhada)
- Cálculos (quando aplicável: conversão de unidades ou aplicação de fatores)
- Controle da Qualidade (externo e interno com periodicidade e faixa de aceitação de valores)
- Interferentes e reações cruzadas
- Valores de referência (referentes à população atendida)
- Linearidade, limites de detecção e limitações do método (que deverão estar congruentes com as necessidades do usuário: sensibilidade, robustez contra fatores externos, incertezas de medição etc.)
- Interpretação dos resultados
- Referências Bibliográficas (fontes dos dados obtidos no procedimento)

2.3 Recursos humanos

O dimensionamento do quadro de pessoal leva em conta algumas características dos laboratórios, tais como: número de amostras processadas por dia, perfil dos pacientes atendidos, presença ou não de atividade científica e/ou didática concomitante, necessidade de supervisão constante, além do horário de funcionamento e prazo determinado para liberação dos laudos.

Em termos de qualificação recomenda-se que os ensaios microbiológicos sejam realizados e supervisionados por pessoal experiente, qualificado em microbiologia ou equivalente. A gerência do laboratório tem o papel de garantir que todo pessoal tenha recebido treinamento adequado para o desempenho competente de ensaios e operação de equipamentos. Isso inclui treinamento em técnicas básicas, tais como semeadura em placas, contagem de colônias, trabalhos em condição de assepsia etc., com o uso de critérios para determinar níveis de aceitação. O pessoal do laboratório somente pode realizar os ensaios se for reconhecidamente capacitado para fazê-lo ou se estiver sob supervisão adequada. A capacitação contínua deve ser monitorada, sendo capaz de detectar necessidades de reciclagem, cuja periodicidade necessita ser estabelecida e documentada. A interpretação dos resultados de ensaio para identificação e verificação de micro-organismos é fortemente relacionada com a experiência do analista e deve ser monitorada regularmente.

Vale lembrar que é importante que o pessoal que realiza ensaios que exigem avaliação de cores seja testado com relação a possível dificuldade de discriminação destas. Isso não significa que pessoas com dificuldade de discriminação de cores não possam atuar em microbiologia, mas apenas que devem exercer outras funções compatíveis com discromatopsias.

2.4 Área física e instalações

A área física deve ser suficiente para permitir que as áreas de trabalho sejam mantidas limpas e arrumadas, sendo o espaço proporcional ao volume de análises realizadas e à organização interna do laboratório. Dependendo dos tipos de ensaio realizados, há necessidade de o acesso ao laboratório microbiológico ser restrito ao pessoal autorizado.

O planejamento da área física de um laboratório de microbiologia necessita atender a alguns requisitos básicos:

- Fluxo de trabalho que minimize riscos de contaminação cruzada. Para tanto pode-se executar as rotinas de maneira sequencial ou separando atividades por tempo

ou espaço. São consideradas necessárias áreas independentes para preparação de meios de cultura, pesquisa e cultura de micobactérias e fungos.

- Ventilação e temperatura apropriada. Isso pode ser obtido por ventilação natural ou forçada ou pelo uso de um condicionador de ar.
- Uso de filtros apropriados quando do uso de condicionadores de ar, inspecionados, conservados e substituídos de acordo com o tipo de trabalho realizado. A temperatura deve ser adequada aos procedimentos realizados e ao fluxo de trabalho da área, mantendo-se registros diários de sua variação.
- Iluminação adequada. Não se recomenda apenas insolação direta, pois esta é muito variável. Recomenda-se que o controle da iluminação seja setorial para que possa ser regulada para as diversas atividades que requerem maior ou menor incidência de luz.
- Programa de limpeza documentado para instalações, equipamentos e superfícies de laboratório, bem como um procedimento para lidar com derramamentos.

2.5 Fase pré-analítica

2.5.1 Requisição

Para garantir a qualidade do exame, é essencial que as requisições para análises microbiológicas contenham algumas informações adicionais relevantes, tais como origem da amostra, tipo de infecção, micro-organismo esperado, uso de antimicrobianos, presença de imunodeficiência, entre outras.

2.5.2 Coleta

A coleta da amostra depende da análise a ser realizada. No manual de coleta constam todas as informações necessárias para coleta dos diversos materiais biológicos (tais como escarro, urina, secreções, feridas, sangue, entre outros), incluindo o procedimento detalhado para sua obtenção, tempo máximo para entrega ao laboratório após a coleta, meios de transporte utilizados (quando apropriado) e métodos de preservação da amostra em caso de demora para processamento. Como frequentemente amostras para exames microbiológicos são coletados por pessoal externo ao laboratório (ex: médicos e equipe de enfermagem), é necessária a existência de orientações específicas sobre conservação, manuseio seguro e transporte dos materiais biológicos para o laboratório.

No caso de líquido cefalorraquidiano (LCR), este deve ser coletado em frasco estéril, sem gel separador e sem a adição de qualquer tipo de conservante. O volume a ser coletado varia de acordo com a idade e as condições do paciente.

Da mesma forma, material proveniente de derrames cavitários também são coletados em frasco estéril sem gel separador e sem a adição de qualquer tipo de conservante. Grandes volumes de amostra podem ser também encaminhados em frascos de hemocultura pois a positividade das culturas aumenta quando um volume maior é utilizado.

Para realização de urocultura, deve-se coletar uma amostra isolada de urina, jato médio após assepsia, tendo o paciente mantido de duas a quatro horas de estase vesical. Essa amostra pode ser randômica (coletada a qualquer momento do dia) ou na primeira urina da manhã.

No caso de hemoculturas, geralmente duas coletas são suficientes, com amostras obtidas antes do pico febril e com um intervalo mínimo de 15 a 20 minutos entre as punções. Havendo solicitação médica de uma terceira amostra esta pode ser obtida após 15 a 20 minutos da coleta anterior ou prazo de até 24 horas. O volume de sangue coletado é uma das variáveis mais críticas para a positividade do exame. Quanto maior o volume coletado maior a probabilidade de positividade, respeitando-se sempre o volume padronizado para cada frasco.

No caso de pacientes com dados clínicos e achados radiológicos sugestivos de tuberculose, recomenda-se que as amostras de escarro para pesquisa e cultura para micobactérias sejam coletadas preferencialmente em três dias consecutivos ou alternados (3 amostras matinais).

2.5.3 Transporte e conservação

Após a coleta, as amostras necessitam ser encaminhadas o mais rapidamente possível ao laboratório a fim de eliminar possível crescimento da microbiota normal. O objetivo primário no transporte de amostras para diagnóstico laboratorial consiste em manter a integridade do material biológico, evitando-se a deterioração. Deve-se evitar condições ambientais adversas como exposição ao frio e calor intensos ou dessecação excessivo. Para minimizar os riscos aos transportadores é necessária a utilização de recipientes adequados, isotérmicos, higienizáveis, impermeáveis, com tampa e devidamente sinalizados para material biológico.

Para pesquisa de BAAR e cultura de BK as amostras devem ser entregues ao laboratório prontamente, idealmente dentro de 30 minutos, ou serem refrigeradas dentro da primeira hora após a coleta e entregues ao laboratório em até 48 horas após a coleta.

2.5.4 Critérios de rejeição

Os critérios de rejeição podem variar para cada laboratório, mas obrigatoriamente incluem: requisição incompleta ou ilegível, material mal identificado ou com contaminação visível a olho nu, material coletado em frascos não estéreis ou com conservantes e amostras insuficientes. Outro critério de rejeição inclui amostras inadequadas para realização do teste solicitado (ex: sonda Foley, material de colostomia, etc.).

2.6 Fase analítica

2.6.1 Microbiologia geral

Reagentes

Os reagentes ou insumos preparados ou aliqüotados pelo laboratório devem conter em seus rótulos: nome, concentração, número do lote (se aplicável), data de preparo, identificação do responsável pelo preparo (quando aplicável), data de validade, condições de armazenamento, além de informações referentes a riscos potenciais e precauções de segurança. Da mesma forma, todos os reagentes, *kits* e meios de cultura comerciais necessitam de armazenamento segundo as orientações do fabricante e devem ser utilizados dentro do prazo de validade.

Os laboratórios são responsáveis por assegurar que a qualidade dos reagentes utilizados seja apropriada para o ensaio em questão. A verificação da adequação de cada lote de reagentes críticos para o ensaio, inicialmente e durante sua validade, é realizada através do uso de micro-organismos-controle positivos e negativos que sejam rastreáveis a coleções de culturas nacionais ou internacionais reconhecidas. Havendo múltiplos componentes em um conjunto de reagentes (*kit*), os diferentes componentes serão utilizados apenas com conjuntos de mesmo lote, a não ser que o fabricante permita o uso interlotes.

O desempenho dos reagentes é sempre avaliado antes ou durante a sua colocação em uso. Para as pesquisas diretas, o uso de materiais de referência ou o teste em paralelo dos reagentes novos *versus* antigos são aceitáveis e seus resultados são documentados apropriadamente. No caso de pesquisas diretas de antígenos em amostras, por meio de conjuntos diagnósticos (*kits*) dotados de controles internos, recomenda-se testar também controles independentes, um positivo e um negativo (organismo ou extrato antigênico) com resultados documentados para cada novo lote ou para cada nova partida recebida. Os controles internos fornecidos pelo fabricante podem ser

usados daí em diante. Não havendo controles internos como parte integrante dos *kits* deve-se testar um controle positivo e um negativo (organismo ou extrato antigênico) a cada dia em que se analisam amostras de pacientes. Para painéis ou baterias, são usados controles para cada antígeno bacteriano pesquisado. Para testes complexos, que incluem uma fase de extração, o sistema é verificado a cada dia de uso por meio de um organismo sabidamente positivo.

Equipamentos

Os equipamentos existentes no laboratório dependem da complexidade e da demanda dos serviços. Os equipamentos, sejam eles nacionais ou importados, devem estar regularizados junto a Anvisa/Ministério da Saúde, de acordo com a legislação vigente.

É obrigatório que todo laboratório tenha um programa documentado para a manutenção, calibração e verificação de desempenho de seus equipamentos. A manutenção de equipamentos críticos é realizada em intervalos especificados, de acordo com vários fatores, como, por exemplo, as especificações do fabricante e a taxa de uso, com registros detalhados de sua execução. Na Tabela 1 encontram-se os equipamentos mais utilizados em um laboratório de microbiologia, bem como os procedimentos de controle de qualidade, periodicidade e limites de tolerância.

Tabela 1 Procedimentos para o controle de qualidade de alguns equipamentos

EQUIPAMENTO	PROCEDIMENTO	PERIODICIDADE	LIMITES DE TOLERÂNCIA
Refrigeradores <i>Freezers</i> Estufas Banho-Maria Aquecedores	Registro de temperatura*	Diário ou contínuo	2°C a 8°C -8°C a -20°C / -60°C a -75°C 35,5°C ± 1°C 36°C a 38°C / 55°C a 57°C ± 1°C do estabelecido
Estufas de CO ₂	Medida do conteúdo de CO ₂ : Usar analisador de gases sanguíneos ou dispositivo Fyrite ¹	Diário ou duas vezes ao dia	5 a 10%
Autoclaves	Teste com tiras de esporos (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	Semanalmente	O não crescimento de esporos indica corrida estéril.
Medidor de pH	Testes com soluções para calibrar pH	A cada uso	± 0,1 unidade de pH do padrão em uso.

EQUIPAMENTO	PROCEDIMENTO	PERIODICIDADE	LIMITES DE TOLERÂNCIA
Jarras de anaerobiose	Tira indicadora com azul de metileno	A cada uso	A conversão da tira de azul para branco indica baixa tensão de CO ₂ .
Câmara anaeróbia com luvas	Cultivo de <i>Clostridium novyi</i> tipo B Solução indicadora de azul de metileno	Periódico	O crescimento indica baixa tensão de O ₂ . Utilizada apenas quando é preciso uma tensão de O ₂ extremamente baixa. A solução permanece incolor se a tensão de O ₂ for baixa.
Rotador de sorologia	Contagem de rpm	A cada uso	180 rpm ± 10 rpm
Centrífugas	Controlar revoluções com tacômetro	Mensalmente	Dentro de 5% do estabelecido no indicador.
Cabines de segurança	Medir a velocidade do ar através da abertura para o rosto ²	Semestral ou trimestralmente	Fluxo de 1,52m de fluxo de ar/minuto ± 0,152 m/minuto.

* cada termômetro de controle deve ser calibrado contra um termômetro padrão.

1. Bacharach Instrument Co, Pittsburgh, PA.
2. Velometer Jr., Alnor Instrument Co., Chicago, IL.

É obrigatório que o laboratório mantenha um programa para calibração e verificação de desempenho dos equipamentos que possuem influência direta sobre os resultados dos ensaios. A frequência de calibração e a verificação de desempenho são determinadas pelo histórico documentado do equipamento e baseadas na necessidade, tipo e desempenho anterior do equipamento (Tabela 2)

Tabela 2 Calibração e verificações de calibração – sugestão de periodicidade

EQUIPAMENTO	REQUISITO	PERIODICIDADE SUGERIDA
Termômetros de referência (líquido em vidro)	Recalibração inteiramente rastreável Um único ponto (p. ex.: verificação do ponto de congelamento)	A cada 5 anos Anualmente
Termopares de referência	Recalibração inteiramente rastreável Verificação com termômetro de referência	A cada 3 anos Anualmente
Termômetros de trabalho e Termopares de trabalho	Verificação com termômetro de referência no ponto de congelamento e/ou faixa de temperaturas operacionais	Anualmente
Balanças	Calibração inteiramente rastreável	Anualmente

EQUIPAMENTO	REQUISITO	PERIODICIDADE SUGERIDA
Pesos de calibração	Calibração inteiramente rastreável	A cada 5 anos
Peso (s) aferidor (es)	Verificação com peso calibrado ou verificação na balança imediatamente após a calibração rastreável	Anualmente
Vidrarias volumétricas	Calibração gravimétrica na tolerância exigida	Anualmente
Microscópios	Calibração rastreável de micrômetro de mesa (onde apropriado)	Após a instalação, antes do uso inicial
Higrômetros	Calibração rastreável	Anualmente
Centrífugas	Calibração rastreável ou verificação com um tacômetro	Anualmente

Uso de controles

As amostras de controle da qualidade são testadas da mesma maneira que as amostras de pacientes e pelo mesmo pessoal que rotineiramente realiza os testes de pacientes. Os resultados dos controles são sempre avaliados antes da emissão do laudo, havendo ações corretivas documentadas quando o controle excede os limites de tolerância. Resultados de controle que se encontrem fora dos critérios de aceitabilidade especificados devem ser imediatamente reportados ao supervisor responsável para que ações corretivas imediatas sejam tomadas.

Resultados de pacientes obtidos em uma rotina analítica cujos controles encontram-se fora dos limites de aceitação ou desde a última rotina aceitável serão re-analisados para determinar se existe alguma diferença clinicamente significativa nos resultados obtidos.

Controle de microscopia

A maneira pela qual o exame microscópico é realizado tem de ser consistente. Para garantir a reprodutibilidade, uma vez que na maioria dos casos não se dispõe de controles de qualidade comerciais, pode-se adotar a prática da dupla observação, e/ou avaliação de um mesmo material por todos os indivíduos e/ou uso de slides ou figuras previamente validadas por consenso. Mensalmente utilizar análise de replicatas ou duplo-cego.

É fundamental que o laboratório disponha de um arquivo de micro-organismos não usuais, como também de atlas, figuras ou outras publicações que auxiliem na identificação dos elementos presentes nos diversos materiais biológicos.

Recomenda-se guardar todas as lâminas por pelo menos uma semana para possível revisão ou referência. Lâminas com achados raros devem ser conservadas por períodos de tempo mais longos, dependendo do espaço disponível. Nesse caso fixar a preparação através de meios de inclusão rápida para microscopia e cobertas com lamínulas.

Vale lembrar que a conservação e manutenção dos microscópios são fundamentais para a qualidade da análise microscópica. *Diariamente* realiza-se a limpeza de partículas de sujeira na ocular, objetivas e condensador com lenço de papel ou lenços próprios para limpeza de lentes. Não utilizar gaze ou papel higiênico. Ao final da rotina retirar resíduos de óleo utilizando um cotonete umedecido com uma solução de álcool – éter (1:1) ou álcool isopropílico 70% (nunca usar xilol), evitando contato com a região periférica das lentes. Pode-se utilizar ainda soluções próprias para limpeza de lentes disponíveis em ópticas. *Semestralmente* procede-se à limpeza da parte interna das oculares e objetivas.

2.6.2 Bacteriologia

Meios de cultura

O laboratório é responsável por garantir que todos os meios de cultura usados, tanto comprados prontos como de preparo próprio, sejam estéreis, capazes de permitir o crescimento adequado dos micro-organismos e apresentem a reatividade bioquímica apropriada. Em geral, o laboratório mantém em estoque cepas de micro-organismos para testar os meios antes ou simultaneamente ao uso, mantendo os registros adequados. Os micro-organismos empregados para o controle de qualidade devem ser mantidos no laboratório por meio de subcultivos de isolados recuperados como parte do trabalho de rotina ou micro-organismo de referência como os da ATCC.

Meios preparados no laboratório

O desempenho apropriado dos meios de cultura, diluentes e outras soluções preparadas no laboratório deve ser verificado com relação à sobrevivência ou recuperação do micro-organismo-alvo, à inibição ou supressão dos micro-organismos não-alvo, às propriedades bioquímicas (diferenciais e diagnósticas) e às propriedades físicas (por exemplo: pH, volume e esterilidade). Na Tabela 3, encontram-se listados os microorganismos-controle e as reações esperadas para o controle de qualidade dos meios de cultura, segundo Winn 2006.

Tabela 3 Micro-organismos-controle e reações para o controle de qualidade dos meios de cultura

MEIO	MICROORGANISMO	REAÇÃO	
Ágar-sangue	<i>Streptococcus</i> do Grupo A <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bom crescimento, beta-hemólise Bom crescimento, alfa-hemólise	
Ágar bile-esculina	Espécies de <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i> alfa-hemolítico não do grupo D	Bom crescimento, cor negra Nenhum crescimento, sem coloração do meio	
Ágar chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Bom crescimento Bom crescimento	
Ágar uréia de Christensen	<i>Proteus mirabilis</i>	Toda a superfície de cor rosa (positivo)	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inclinação do meio rosa (positivo parcial)	
	<i>Escherichia coli</i>	Cor amarela (negativo)	
Ágar citrato de Simmons	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Crescimento ou cor azul (positivo)	
	<i>Escherichia coli</i>	Sem crescimento, permanece verde (negativo)	
Ágar cistina-tripticase (ACT)	- Dextrose	- Cor amarela (positivo) - Não modifica a cor (negativo)	
	- Sacarose	- Cor amarela (positivo) - Não modifica a cor (negativo)	
	- Maltose	Espécies de <i>Salmonella</i> ou <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- Cor amarela (positivo) - Não modifica a cor (negativo)
	- Lactose	<i>Neisseria lactamicus</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- Cor amarela (positivo) - Não modifica a cor (negativo)
Descarboxilases	- Lisina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter sakasaki</i>	- Cor azulada (positivo) - Cor amarela (negativo)
	- Arginina	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	- Cor azulada (positivo) - Cor amarela (negativo)
	- Ornitina	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- Cor azulada (positivo) - Cor amarela (negativo)
DNase	<i>Enterobacter cloacae</i>	Zona de clarificação (adicionar HCl 1 N)	
	<i>Serratia marcescens</i>	Sem zona de clarificação	

MEIO	MICROORGANISMO	REAÇÃO
Ágar eosina azul-de-metileno	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Shigella flexneri</i>	Bom crescimento, brilho verde metálico Bom crescimento, púrpuras, sem brilho Bom crescimento, transparentes (lactosenegativas)
Ágar de Hecktoen	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Escherichia coli</i>	Verdes com centro negro Verdes transparentes Crescimento algo inibido, alaranjadas
Indol	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cor vermelha (positivo) Ausência de cor vermelha (negativo)
Ágar lisina-ferro	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Profundidade e inclinação púrpura + H ₂ S Inclinação púrpura / profundidade amarela Inclinação vermelha / profundidade amarela
Ágar MacConkey	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> Espécies de <i>Enterococcus</i>	Colônias vermelhas (lactose-positivas) Colônias incolores, sem disseminação Sem crescimento
Malonato	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sem crescimento Bom crescimento, cor azul (positivo)
Motilidade	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meio turvo (positivo) Sem borda plumosa em estria (negativo)
Caldo ou ágar nitrato	<i>Escherichia coli</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i>	Cor vermelha ao adicionar reativos Ausência de cor vermelha (negativo)
Ágar sangue feniletil álcool	Espécies de <i>Streptococcus</i> <i>Escherichia coli</i>	Bom crescimento Sem crescimento
o-Nitrofil-beta-Dgalactopiranosídeo (ONPG)	<i>Serratia marcescens</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Cor amarela (positivo) Incolor (negativo)
Fenilalanina desaminase	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Cor verde (adicionar FeCl ₃ a 10%) Ausência de cor verde (negativo)
Ágar Salmonella-Shigella	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i>	Colônias incolores, centro negro Sem crescimento
Voges-Proskauer	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Cor vermelha (adicionar reativos) Não desenvolve cor (negativo)

MEIO	MICROORGANISMO	REAÇÃO
Ágar xilose-lisina-dextrose (XLD)	Espécies de <i>Salmonella</i>	Colônias vermelhas (lisina-positivas)
	<i>Escherichia coli</i>	Colônias amarelas (positiva para açúcares)
	Espécies de <i>Shigella</i>	Colônia transparentes (negativo)

Matérias-primas (formulações comerciais desidratadas e constituintes individuais) devem ser armazenadas sob condições apropriadas, em ambiente frio, seco, protegido da luz e em recipientes hermeticamente fechados, especialmente aqueles com meios desidratados. Meios que apresentem qualquer tipo de alteração de cor ou aspecto não podem ser usados. A água utilizada na preparação dos meios pode ser destilada, deionizada, ou produzida por osmose reversa, livre de substâncias bactericidas, inibidoras ou interferentes.

A validade dos meios preparados, mantidos nas condições definidas de armazenamento, deve ser determinada e controlada.

Meios prontos para uso

Para meios comprados prontos para uso, o laboratório deve ter registros de que cada lote tenha sido testado quanto à esterilidade, à capacidade de favorecer o crescimento dos organismos pretendidos e à reatividade bioquímica, antes ou coincidentemente ao início do uso.

É obrigação do fabricante fornecer as especificações de qualidade do seu produto, incluindo:

- Nome dos meios e lista dos ingredientes, incluindo quaisquer suplementos.
- Prazo de validade e critérios de aceitação aplicados.
- Condições de armazenamento.
- Frequência de amostragem.
- Verificação da esterilidade.
- Verificação de crescimento dos micro-organismos de controle-alvo e não-alvo (com suas referências da coleção de cultura) e Critérios de aceitação.
- Verificações físicas e critérios de aceitação aplicados.
- Data de edição da especificação.

Lotes de meios devem ser identificáveis, sendo acompanhados pela evidência de que satisfazem a especificação de qualidade. O laboratório deverá se certificar de que o fabricante notificará quaisquer alterações na especificação da qualidade do produto.

Corantes

Todos os procedimentos de coloração são controlados, com seu desempenho registrado pelo menos semanalmente e para cada novo lote ou partida de corante em uso, com organismos de referência sabidamente gram-positivos e gram-negativos. Outras colorações que não a de Gram (colorações não-imunofluorescentes e não-imunológicas) são testadas com o uso de controles positivos e negativos para a reatividade pretendida a cada dia de uso e a cada novo lote ou partida recebida.

Controles positivos e negativos são processados em todas as colorações especiais para bactérias. As colorações são verificadas a cada dia de uso ou pelo menos semanalmente (o que for mais adequado) para a reatividade pretendida de modo a garantir o desempenho consistente da coloração. Da mesma forma, controles positivos e negativos são processados a cada vez em que se utilizam colorações fluorescentes.

Reagentes e controles

Para cada novo lote de reagentes para testes qualitativos, a mínima verificação cruzada inclui a análise de uma amostra sabidamente positiva e de uma amostra sabidamente negativa. É preferível que essas validações sejam realizadas utilizando-se amostras de pacientes que tenham sido testados anteriormente, ou que possam ser testadas simultaneamente com o lote anterior. Em alguns casos as comparações entre lotes podem apresentar dificuldades práticas, como por exemplo para a pesquisa direta de *Shigella* nas fezes, uma vez que amostra é instável e os positivos são raros. Em situações em que a maior parte das amostras ou organismos provenientes de pacientes reage muito intensamente ao teste de interesse pode ser preferível usar controles bem caracterizados, fracamente positivos, para validar a sensibilidade do novo lote de reagentes.

Controles positivos e negativos são testados e registrados para cada novo lote, novo lote ou nova partida recebida dos seguintes testes: reagentes para catalase, coagulase, oxidase; discos para bacitracina, optoquina, ONPG, X, V e XV; e sistemas de identificação. Controles positivos e negativos também são testados e registrados para cada novo lote recebido de anti-soros (exceto *Salmonella* e *Shigella* que são testados quando preparados ou abertos e a partir daí uma vez a cada seis meses). Da mesma forma, controles positivos e negativos para beta-lactamase (que não cefinase) são testados e registrados a cada dia de uso. Por outro lado, no caso da cefinase, há necessidade de testar apenas a cada novo lote.

Tiras de azul de metileno, culturas de organismos anaeróbicos fastidiosos ou outros procedimentos adequados são usados para a verificação da anaerobiose nos sistemas como jarras, câmaras e sacos para anaerobiose.

Antibiograma

Falhas na detecção do padrão de resistência podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como: má qualidade do meio de cultura, disco com baixa concentração de antimicrobiano, problemas no procedimento, inóculo com concentração de micro-organismos fora do preconizado, tempo e temperatura de incubação inapropriados.

A potência dos discos para antibiograma é verificada por meio de testes utilizando organismos de referência cujos padrões de susceptibilidade são conhecidos. Limites de tolerância para a potência dos antimicrobianos (intervalo dos halos) são estabelecidos, sempre que possível de acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, antigo NCCLS).

As cepas de referência têm um número máximo de gerações ao qual podem ser submetidas, são cinco passagens a partir da cepa de referência original. O número indefinido de passagens pode comprometer principalmente a pureza da cultura e as características fenotípicas de algumas bactérias. As cepas de controle da qualidade devem ser testadas usando os mesmos materiais e métodos empregados para testes de isolados clínicos.

A frequência dos testes de controle interno deve ser no mínimo mensal. Entretanto, publicações recentes da Anvisa, em seu projeto de "Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde", e do CLSI preconizam testes semanais. Essas recomendações devem ser seguidas se a estrutura ou a capacidade do laboratório permitir.

A introdução do programa de controle interno da qualidade inicia-se com a realização de testes diários, passando, em fase posterior, para a realização mensal dos testes.

- **Teste diário** – Testar todas as cepas de controle pertinentes durante cinco dias consecutivos e documentar os resultados. Para passar a realização dos testes de diária para mensal, nenhuma das cinco leituras de halos, para cada combinação de agente/antimicrobiano, pode estar fora dos limites aceitáveis.
- **Teste mensal** – Testar todas as cepas de CIQ no mínimo mensalmente e sempre que qualquer novo reagente do teste for utilizado (ex.: um novo

lote de meio de cultura, um novo lote de discos ou outro fabricante de insumos).

É obrigatório que a realização dos testes de controle da qualidade seja documentada, anotando-se os números dos lotes, meios de cultura, reagentes, discos de antibióticos testados nas respectivas datas. Caso algum resultado do teste mensal de controle da qualidade encontrar-se fora da faixa aceitável, faz-se necessário implantar ação corretiva.

Sempre que um novo agente antimicrobiano for acrescentado ou houver mudanças importantes no método de leitura dos resultados dos testes, estes devem ser realizados por cinco dias consecutivos e documentados, antes de se passar para uma frequência mensal.

O controle da acurácia dos testes realizados deve ser feito utilizando-se as cepas de referência para o gênero ou espécie do micro-organismo ou classe de antimicrobiano que está sendo testado. Serão testados os antimicrobianos que fazem parte do antibiograma utilizado na rotina do laboratório. Por exemplo: se o laboratório testa para *Enterococcus* spp. ampicilina, ciprofloxacina, clorafenicol, teicoplanina, vancomicina, quinupristin/dalfopristin, estes mesmos antimicrobianos serão testados com a cepa referência *S. aureus* ATCC 25923 para avaliar a qualidade da prova realizada, e os halos encontrados serão comparados com os valores de referência. Os limites aceitáveis para os halos encontrados para as cepas de referências e os diversos antimicrobianos são descritos no documento M100-S16/CLSI ou norma substituta.

É recomendável que o laboratório de microbiologia hospitalar estabeleça intercâmbios com a equipe médica (CCIH) e a farmácia para desenvolver uma lista de antibióticos a ser reportada no laudo para os diferentes organismos isolados de diferentes locais. Essa lista é baseada nas diretrizes do CLSI, nas tabelas de rotina (Grupo A) e seletiva (Grupo B). Limitações ao número de antimicrobianos reportados, chamada de “laudo em cascata”, em geral significa reportar não mais do que 4 agentes potenciais aos quais, pelo menos em uma instância, o organismo é susceptível. O laudo seletivo ajuda a melhorar a relevância clínica e ajuda a minimizar a seleção de cepas multirresistentes e a evitar o abuso de agentes de amplo espectro. O laboratório pode, igualmente, reportar apenas os agentes antimicrobianos efetivos no local do isolamento, havendo documentação da padronização adotada. Os laboratórios hospitalares devem participar da CCIH de forma a manter e reportar ao corpo clínico relatórios cumulativos do perfil de susceptibilidade antimicrobiana, pelo menos anualmente.

Resultados aceitáveis derivados dos testes das cepas controle não garantem resultados acurados dos isolados de pacientes. Quando forem observados resultados incomuns ou inconsistentes de isolados de pacientes, os resultados são analisados criticamente para a garantia da sua acurácia. Recomenda-se inicialmente verificar a pureza da cultura e confirmar a identificação usando procedimentos alternativos (se disponíveis), principalmente quando observa-se:

- *Escherichia coli* resistente ao imipenem;
- *Klebsiella* spp. suscetível a ampicilina;
- *Proteus mirabilis* resistente a ampicilina;
- *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina.

2.6.3 Procedimentos analíticos

Os itens a seguir definem padrões mínimos para a rotina. Isso não impede o uso de culturas de triagem (estudos limitados) e não implica que todas as culturas de rotina exijam meios especiais, mas sim que estes estejam disponíveis quando necessários.

Culturas de material proveniente do trato respiratório

Inicialmente, sugere-se a realização rotineira de um esfregaço corado pelo Gram em todos os escarros expectorados para determinar a aceitabilidade da amostra para a cultura e a abrangência das pesquisas a serem realizadas. As amostras inaceitáveis não devem ser processadas, e/ou o médico assistente deve ser notificado para que seja providenciada uma amostra adequada de imediato.

Potenciais patógenos podem fazer parte da flora oral dos pacientes e pode não ser necessária identificação e realização de antibiogramas, quando houver evidências de contaminação grosseira do escarro com saliva. Deve-se tentar estabelecer uma correlação entre os resultados das culturas com os resultados da coloração de Gram e, quando possível, com informações clínicas obtidas junto ao médico assistente quanto a evidências de uma possível pneumonia.

Os procedimentos de rotina para a cultura de amostras aceitáveis de escarro permitem o isolamento de pneumococos, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacteriaceae*.

Culturas de Urina

O padrão mínimo para a avaliação das culturas de urina inclui uma estimativa do número de organismos isolados e sua classificação em Gram-positivos

ou Gram-negativos. As culturas quantitativas (contagem de colônias) devem ser realizadas rotineiramente, utilizando-se meios e procedimentos adequados ao isolamento e à identificação tanto de Gram-positivos como de Gram-negativos.

Culturas de Material Ginecológico

A triagem para *Streptococcus* Grupo B em mulheres grávidas é feita de acordo com as diretrizes atuais, que recomendam a triagem universal para colonização vaginal e retal por *estreptococos* do Grupo B para todas as mulheres gestantes entre a 35-37^a semanas.

Coproculturas

Os procedimentos de rotina para o processamento de amostras quanto a patógenos devem permitir o isolamento e a identificação de patógenos entéricos relevantes em pacientes com diarreia.

Culturas de Líquor

Amostras de líquido para cultura necessitam ser processadas imediatamente após seu recebimento no laboratório. Esfregaços para coloração de Gram são preparados de rotina, e os resultados positivos são liberados de acordo com a política de comunicação de resultados potencialmente críticos. Os tipos de meios inoculados e os métodos de incubação devem garantir a recuperação de patógenos comuns e exigentes como a *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e o *Haemophilus influenzae*.

Quando se utiliza métodos de pesquisa de antígenos, culturas de segurança são realizadas, tanto para amostras positivas como para amostras negativas.

Hemoculturas

O volume de sangue coletado deve obedecer as especificações do fabricante dos frascos de hemocultura. Os sistemas de uso na rotina para a realização de hemoculturas permitem o isolamento e a identificação de aeróbios e, quando indicado, de anaeróbios. Todas as culturas negativas macroscopicamente são verificadas por meio de coloração de Gram ou de subcultivo aeróbico, em algum momento, antes de serem liberadas como negativas, lembrando que hemoculturas automatizadas não necessitam dessa conferência adicional desde que tenham sido monitorizadas por pelo menos 5 dias.

As hemoculturas positivas são liberadas de acordo com a política de comunicação de resultados potencialmente críticos.

Culturas de material de feridas

Para as feridas profundas, os procedimentos mínimos permitem a recuperação e a identificação de organismos aeróbios e moderadamente anaeróbios. Esfregaços diretos corados pelo Gram são preparados e examinados de rotina. Os procedimentos para a coleta e o manejo de amostras de feridas são capazes de recuperar organismos anaeróbios, quando indicado e em material coletado adequadamente

2.6.4 Micobacteriologia

Meios de cultura

Da mesma forma que na bacteriologia uma amostra adequada de cada meio e aditivo preparados pelo laboratório é verificada com relação a esterilidade (caso sejam adicionados aditivos após a esterilização inicial), capacidade de favorecer o crescimento (quando aplicável) por meio de cultivo de cepas controle ou de testes em paralelo com lotes anteriores e reatividade bioquímica (quando adequado). Meios micobacteriológicos deteriorados são descartados.

Coloração

As colorações para bactérias álcool ácido resistentes são controladas a cada dia de uso por meio de cepas controle adequadas e os resultados registrados. As colorações fluorescentes são verificadas com o uso de controles positivos e negativos a cada dia e os resultados são registrados. Resultados positivos na pesquisa para micobactérias são liberados de acordo com a política de comunicação de resultados críticos.

Procedimentos

– Concentração, inoculação e incubação

Amostras potencialmente contaminadas com outros micro-organismos (ex. escarro, lavado brônquico) quando submetidas à cultura para micobactérias são descontaminadas e concentradas. A coloração para B.A.A.R. é realizada em lâminas preparadas do material antes e após a concentração. Havendo uma quantidade adequada de material, o laboratório inocula as amostras (que não sangue) em meio apropriado.

– Culturas e identificação

Caso o laboratório ofereça a identificação completa é necessária uma variedade de testes diferenciais suficientes para a diferenciação acurada dos diferentes tipos de micobactérias. Controles positivos e negativos são testados rotineiramente e seus resultados registrados.

2.6.5 Micologia

Meios de cultura

Assim como na bacteriologia e na micobacteriologia, todos os meios são verificados quanto à esterilidade (se forem adicionados aditivos após a esterilização), quanto à capacidade de favorecer o crescimento e quanto à reatividade bioquímica (quando aplicável) por meios de cepas controle ou testes em paralelo contra lotes anteriores.

Colorações

Todos os procedimentos de coloração são verificados e seus resultados registrados para cada novo lote de corante preparado, e pelo menos diariamente, contra cepas controle sabidamente positivas e negativas. Controle para preparações de KOH não são necessários. Controles para o lactofenol-azul de algodão não precisam ser feitos a cada dia de uso, mas devem ser feitos a cada novo ou preparado. Para certas colorações, como Prata Metenamina de Gomori e Giemsa, a própria lâmina serve de controle negativo.

Procedimentos e testes

O princípio da garantia da qualidade dos procedimentos analíticos em micologia baseia-se no uso de meios e condições de cultura variados o suficiente para permitir o isolamento de patógenos significativos, com a menor interferência possível de contaminantes.

Os procedimentos preliminares, de triagem tais como KOH 10%, tinta da China ou Giemsa estão disponíveis e são realizados quando indicado. Os procedimentos de isolamento e identificação incluem a triagem preliminar pelo exame de preparações diretas ou coradas, pelo uso de meios seletivos para dermatófitos e fungos sistêmicos e pelo uso de meios contendo agentes antimicrobianos.

Meios adicionais ou diferentes são usados para a cultura de dermatófitos e/ou fungos sistêmicos. Meios contendo agentes antimicrobianos são usados, quando indicado, para a supressão do crescimento de bactérias, embora alguns agentes antimicrobianos possam inibir algumas leveduras ou a fase leveduriforme de organismos dimórficos. As temperaturas de incubação para o crescimento e o isolamento de dermatófitos e de fungos sistêmicos devem estar definidas e seguidas rigorosamente. Quando as culturas são deixadas à temperatura ambiente (22-26°C), esta deve controlada, verificada e registrada a cada dia.

2.6.6 Processos Automatizados

É obrigatório o controle e registro dos lotes e validade dos insumos em uso. No caso da utilização de turbidímetro, deve-se calibrar e registrar a transmittância diariamente.

Os requisitos mínimos para controle de qualidade em processos automatizados são os que se seguem:

Cepas de referência recomendadas para testes de identificação

Recomenda-se testar no mínimo uma cepa de referência por painel.

– Para painéis de Gram-negativos:

- *E. coli* 25922 (qualidade da prova).
- *P. mirabilis* 7002 (qualidade da prova de identificação de bacilos Gram-negativo).
- *K. pneumoniae* 13883 (qualidade da prova de identificação de bacilos Gram-negativo).

– Para painéis de Gram-positivos:

- *S. aureus* 29213 (qualidade da prova de identificação de bacilos Gram-positivo).
- *E. faecalis* 29212 (qualidade da prova de identificação de bacilos Gram-positivo).

– Para painéis de Leveduras:

- *C. albicans* 14053 (qualidade da prova de identificação de leveduras).

Cepas de referência recomendadas para testes de sensibilidade

– Para painéis de Gram-negativos:

- *E. coli* 25922 (qualidade da prova).
- *E. coli* 35218 (para inibidores de β lactamase).
- *E. coli* 51446 (ESBL).
- *P. aeruginosa* 27853 (concentração de cátions e pH com aminoglicosídeos).
- *E. faecalis* 29212 (quantidade de timina-timidina com SXT).
- *K. pneumoniae* 700603 (ESBL).
- *K. pneumoniae* BAA – 1705 (Controle positivo para carbapenemase)
- *K. pneumoniae* BAA – 1706 (Controle negativo para carbapenemase)

– Para painéis de Gram-positivos:

- *S. aureus* 29213 (qualidade da prova).
- *E. faecalis* 29212 (quantidade de timina-timidina com SXT).
- *E. faecalis* 51299 (resistência a vancomicina).
- *E. coli* 35218 (para inibidores de β lactamase).

Validação

– Protocolo de controle da qualidade diário

- Prova diária por 5 dias
 - Sem erro, seguir com o controle periódico.
 - ≥ 1 de cada 5 ensaios apresentarem erro, tomar ações corretivas:
erros óbvios: testar novamente no mesmo dia e, se o resultado for o esperado, continuar com as provas diárias.
erros não óbvios: testar novamente no mesmo dia e controlar por cinco dias consecutivos. Se todos os resultados estiverem dentro do esperado, passar ao controle mensal.

– Protocolo de controle da qualidade periódico

- Recomenda-se realizar os controles a cada mês, utilizando as listas de cepas de referência acima mencionadas. Também deve ser realizado um controle a cada troca de lote do painel. Se os testes mensais apresentarem erros, tomar ações corretivas e retornar aos testes diários.

2.6.7 Testes de Proficiência

É obrigatória a participação em um programa de proficiência em ensaios laboratoriais. Para as análises não cobertas por programa de proficiência, o laboratório deve dispor de um sistema alternativo documentado para avaliação da confiabilidade dos resultados. A utilização do controle alternativo baseia-se em grande parte em documentos do CLSI no caso o GP29-A, que estabelece que inicialmente o laboratório tem que identificar os testes não cobertos pelos programas de proficiência e desenvolver uma alternativa de controle. Uma vez definido como será feito esse controle, documentá-lo, estabelecer limites de aceitação e definir a frequência de utilização.

Na prática, o uso de controles alternativos permitem uma estimativa da exatidão dos resultados liberados na rotina e permite que o laboratório atenda aos requisitos dos programas de gestão de qualidade. Entretanto, é uma prática difícil de gerenciar e de estabelecer os limites de aceitação dos resultados. Assim, o controle de qualidade alternativo não pode ser encarado como um substituto dos testes de proficiência, mas sim como uma alternativa possível na indisponibilidade dos ensaios de proficiência.

2.7 Fase pós-analítica

2.7.1 Conferência

Todo laboratório necessita de um sistema documentado para detectar e corrigir erros significativos de transcrição que poderiam afetar a conduta clínica. Uma alternativa é a revisão e conferência dos resultados finais por um indiví-

duo qualificado para tal, antes da liberação final dos resultados, uma vez que a maioria dos resultados não são interfaceados e sim digitados manualmente. O sistema de informática pode dispor de alertas, na etapa de digitação, para resultados improváveis ou absurdos. Cada laboratório define quais os resultados que serão reportados imediatamente ao médico responsável pelo paciente.

2.7.2 Liberação dos laudos e notificação de resultados críticos

O laboratório deve possuir políticas e instruções escritas para a emissão de laudos que contemplem as situações de rotina, os plantões e as urgências. Essas instruções incluem quem pode liberar os resultados e para quem, contemplando também a liberação de resultados verbais e de laudos provisórios, quando aplicável e necessário.

É necessário que os resultados das culturas sejam reportados o mais rapidamente possível, dispondo-se de critérios documentados para notificação imediata ao médico ou responsável de resultados potencialmente críticos que possam implicar a necessidade de atuação médica imediata. As comunicações verbais e os laudos provisórios são registrados e identificados como tal, gerando-se laudos definitivos adequados no menor intervalo possível. Essa atividade deve ser devidamente registrada, mesmo quando o contato não for conseguido. Esses registros incluem o resultado potencialmente crítico, a data e horário da notificação, o responsável pela comunicação e a pessoa notificada ou ainda a impossibilidade de comunicação e motivo.

2.8 Referências Bibliográficas

Anvisa. Habilitação para Laboratório de Microbiologia. Séries Temáticas, Laboratório, volume 3, 2006. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/reblas/eurachem/acreditacao.pdf> Último acesso em 12/03/2007

CLSI / NCCLS. Assessment of Laboratory Tests When Proficiency Testing is Not Available; Approved Guideline (GP29-A) 2002.

CLSI / NCCLS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Seventh Edition (M7-A7) 2006

CLSI / NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Ninth Edition (M2-A9) 2006.

CLSI / NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th Informational Supplement (M100-S17) 2007.

CLSI / NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22th Informational Supplement (M100-S22) 2012.

College of American Pathologists. Commission On Laboratory Accreditation – Laboratory Accreditation Program, Microbiology Checklist, 2006. Disponível em http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists/microbiology__october2006.pdf Último acesso em 12/03/2007

Eurachem / Ea Guide 04/10. Accreditation for Microbiological Laboratories, 2002. Disponível em http://www.eurachem.ul.pt/guides/EurachemEA_Micro.pdf Último acesso em 12/03/2007.

Oplustil, CP et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. São Paulo: Sarvier, 2004. Programa para Acreditação de Laboratórios Clínicos. Regulamento do Palc, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, norma 2010. Disponível em <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320101013112151.pdf> Último acesso 29/01/2013.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade antimicrobianos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf Último acesso em 12/03/2007.

Winn Jr, W et al Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.



**Acesse o site
da ANVISA**

Baixe o leitor de QR
Code em seu celular e
fotografe este código

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa
SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200
CEP: 71205-050
Brasília - DF
Telefone: 61 3462 6000

www.anvisa.gov.br
www.twitter.com/anvisa_oficial
Anvisa Atende: 0800-642-9782
ouvidoria@anvisa.gov.br