

Manual Nacional de **VIGILÂNCIA** **LABORATORIAL** da **TUBERCULOSE** e outras **MICOBACTÉRIAS**



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância Epidemiológica

Manual Nacional de **VIGILÂNCIA LABORATORIAL** da **TUBERCULOSE** e outras **MICOBACTÉRIAS**

© 2008 Ministério da Saúde

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta 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 coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Tiragem: 1ª edição – 2008 – 2.550 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de Vigilância Epidemiológica

Núcleo de Comunicação/GAB/SVS

Esplanada dos Ministérios, Bloco G,

Edifício Sede, sobreloja, sala 134

CEP: 70058-900, Brasília – DF

E-mail: svs@saude.gov.br

Home page: <http://www.saude.gov.br/svs>

Produção editorial:

Coordenação: Fabiano Camilo

Projeto gráfico, diagramação e revisão: All Type Assessoria Editorial Ltda

Apoio

Fundo Global - Projeto Tuberculose Brasil

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.

Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

436 p. : il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

ISBN 978-85-334-1447-1

1. Doença crônica. 2. Tuberculose. 3. Diagnóstico. 4. Doenças infecciosas. I. Título. II. Série.

NLM WT 500

Catalogação na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2008/0111

Títulos para indexação:

Em inglês: National Manual for the Laboratory Surveillance of Tuberculosis and others Mycobacterias

Em espanhol: Manual Nacional de la Vigilancia Laboratorial de la Tuberculosis y otras Micobacterias

Sumário

Prefácio	9
-----------------	----------

Apresentação	11
---------------------	-----------

Equipe de elaboração	12
-----------------------------	-----------

CAPÍTULO 1	13
ORGANIZAÇÃO E GERÊNCIA DA REDE DE LABORATÓRIOS DE TUBERCULOSE	

1.1	Introdução	13
1.2	Organização da rede nacional de laboratórios	14
1.3	Hierarquia na rede nacional de laboratórios de tuberculose.	16
1.3.1	Rede hierarquizada de execução de exames para o controle da tuberculose e outras micobactérias	19
1.4	Funções e competências do LRN, LRR, LRE/LACEN, LRM, LL e LF para o controle da tuberculose	21
1.5	Capacitação, visita técnica	26
1.6	Administração laboratorial e manutenção de registros	31
1.6.1	Procedimentos Operacionais Padrão (POP)	32
1.6.2	Formulários de laboratório	32
1.6.3	Registros laboratoriais	33
1.7	Monitoramento da saúde dos profissionais	34
1.8	Referências.	35
1.9	Anexos do capítulo.	36

CAPÍTULO 2	47
SISTEMA DE GARANTIA DA QUALIDADE DA BACILOSCOPIA	

Siglas e definições	47
2.1 Descrição	49
2.2 Controle de Qualidade Interno (CQI)	50
2.3 Melhoria da Qualidade (MQ)	55
2.4 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	55

2.4.1	Teste de Proficiência (TP)	57
2.4.2	Releitura de lâminas	57
2.4.3	Visita técnica aos laboratórios locais	65
2.5	Responsabilidade dos laboratórios em relação à Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	67
2.6	Benefícios da AEQ para o Ministério da Saúde e para os laboratórios .	68
2.7	Indicadores para avaliação de desempenho do laboratório	68
2.8	Referências	73
2.9	Anexos do capítulo	74

CAPÍTULO 3	105
BIOSSEGURANÇA	

3.1	Descrição	105
3.2	Barreiras de contenção primárias	106
3.2.1	Boas práticas microbiológicas	106
3.2.2	Equipamentos de Proteção Individual (EPI)	106
3.2.3	Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC)	107
3.3	Barreiras de contenção secundária	109
3.3.1	Instalações laboratoriais	109
3.4	Transporte de amostras biológicas	111
3.4.1	Transporte intra e interlaboratorial de amostras clínicas. . .	111
3.4.2	Transporte intra e interlaboratorial de lâminas com esfregaço	112
3.4.3	Transporte interlaboratorial de cepas de micobactérias . . .	112
3.5	Procedimentos em casos de acidentes	113
3.6	Uso adequado dos equipamentos de laboratório	115
3.7	Referências	117
3.8	Anexos do capítulo	119

CAPÍTULO 4	121
MICOBACTÉRIAS	121

4.1	Descrição	121
4.2	Referências	125

CAPÍTULO 5 **127**

AMOSTRAS CLÍNICAS

5.1	Descrição	127
5.2	Seleção e tipos de amostras	127
5.3	Amostras de origem pulmonar	128
5.4	Amostras de origem extrapulmonar	130
5.5	Solicitação de exames	132
5.6	Considerações gerais para coleta e armazenamento de amostras clínicas	133
5.7	Orientações para coleta de escarro espontâneo	134
5.8	Instruções para coleta de escarro induzido	136
5.9	Recepção de amostras no laboratório	136
5.10	Controle de qualidade	137
5.10.1	Recebimento de amostras	137
5.10.2	Aspectos físicos do escarro	137
5.10.3	Qualidade das amostras de escarro espontâneo	138
5.11	Referências	139
5.12	Anexos do capítulo	140

CAPÍTULO 6 **145**

BACILOSCOPIA

6.1	Descrição	145
6.2	Métodos de execução do esfregaço	146
6.3	Fixação do esfregaço	154
6.4	Métodos de coloração	155
6.4.1	Método de Ziehl-Neelsen	156
6.4.2	Método da fluorescência com Auramina O	161
6.5	Leitura e interpretação dos resultados	164
6.6	Registro dos resultados	171
6.7	Controle de qualidade	172
6.8	Referências	173
6.9	Anexos do capítulo	174

CAPÍTULO 7 179

CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS

7.1	Descrição	179
7.2	Crítérios para realização da cultura	179
7.3	Métodos de cultura	180
7.4	Etapas da cultura	181
7.5	Pré-tratamento das amostras	181
7.6	Agentes fluidificantes-descontaminantes	183
7.7	Meios de cultura	183
7.8	Incubação.	185
7.9	Leitura, interpretação e registro dos resultados	185
7.10	Métodos clássicos de cultura	185
7.10.1	Método de Petroff modificado	186
7.10.2	Método de N-Acetil-L-Cisteína-Hidroxido de Sódio (NALC-NaOH)	190
7.10.3	Método de Ogawa-Kudoh	194
7.10.4	Método do Ácido oxálico	197
7.11	Procedimentos para incubação nos métodos clássicos.	200
7.12	Procedimentos de leitura, interpretação e registro dos resultados nos métodos clássicos.	201
7.13	Subcultivo	204
7.14	Sistemas comerciais automatizados de cultura	206
7.15	Controle de qualidade da cultura.	212
7.15.1	Controle de qualidade interno	212
7.15.2	Controle de qualidade externo	226
7.16	Referências.	227
7.17	Anexos do capítulo.	229

CAPÍTULO 8 265

IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

8.1	Descrição	265
8.2	Material para os testes fenotípicos para separação das espécies do Complexo <i>M. tuberculosis</i> das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT) e diferenciação das espécies do Complexo <i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	266

8.3	Pré-requisitos para identificação de espécies	267
8.3.1	Preparo da suspensão bacteriana	268
8.3.2	Isolamento de colônias.	269
8.4	Separação das espécies do Complexo <i>M. tuberculosis</i> das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT)	270
8.4.1	Análise microscópica da cultura	270
8.4.2	Análise macroscópica da cultura	272
8.4.3	Teste de inibição de crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico 500 µg/ml.	273
8.4.4	Teste da Niacina	274
8.5	Diferenciação dos membros do Complexo <i>M. tuberculosis</i>	275
8.5.1	Testes Fenotípicos para diferenciação das espécies do Complexo <i>M. tuberculosis</i>	277
8.6	Identificação fenotípica das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT)	285
8.7	Controle de qualidade interno	294
8.8	Identificação molecular pelo Método Molecular de PRA- <i>hsp65</i>	297
8.9	Testes fenotípicos e moleculares combinados.	306
8.10	Considerações sobre critérios para diagnóstico de doença causada por MNT.	308
8.11	Referências.	309
8.12	Anexos do capítulo.	312

CAPÍTULO 9

323

TESTE DE SENSIBILIDADE PARA MICOBACTÉRIAS

9.1	Descrição	323
9.2	Vigilância da resistência às drogas	323
9.3	Mecanismo de resistência.	324
9.4	Crítérios para realização do Teste de Sensibilidade.	326
9.5	Métodos de Teste de Sensibilidade.	326
9.6	Método das proporções em meio LJ.	327
9.7	Sistemas comerciais automatizados de TS	340
9.8	Teste de Sensibilidade para drogas alternativas	348
9.9	Controle de qualidade interno	357
9.10	Controle de qualidade externo	361
9.11	Referências	363
9.12	Anexos do capítulo.	366

CAPÍTULO 10 **393**

CONSERVAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

10.1	Descrição	393
10.2	Métodos de congelamento	393
10.3	Manutenção de Cepas Padrão ou Controles de Referência.	398
10.4	Referências.	401
10.5	Anexos do capítulo	402

CAPÍTULO 11 **405**

USO E MONITORAMENTO DE EQUIPAMENTOS

11.1	Descrição	405
11.2	Equipamentos	406
11.2.1	Agitador mecânico	406
11.2.2	Autoclave	407
11.2.3	Balanças	408
11.2.4	Banho-maria.	410
11.2.5	Cabine de Segurança Biológica (CSB)	410
11.2.6	Capela de Exaustão (CE)	412
11.2.7	Centrífuga e microcentrífuga	413
11.2.8	Coagulador de meio de cultura	416
11.2.9	Cuba e fonte de eletroforese	417
11.2.10	Destilador de água	418
11.2.11	Estufas bacteriológicas	419
11.2.12	Freezer e refrigerador	420
11.2.13	Medidor de pH	421
11.2.14	Micropipetadores	423
11.2.15	Microscópio	424
11.2.16	Termociclador	425
11.2.17	Termômetros	426
11.3	Referências	429
11.4	Anexos do capítulo	430

Prefácio

Foi com grande satisfação que aceitei o convite e a incumbência de escrever o prefácio para este manual, pois o considero também uma oportunidade para prestar homenagem aos milhares de profissionais de laboratório da bacteriologia da tuberculose que, durante décadas, vêm dando sustentação tecnológica aos programas de controle da tuberculose no País, tanto para o diagnóstico da doença como para o controle do tratamento.

Quando se fala em tempos pretéritos, a bacteriologia da tuberculose passa a ser sinônimo de baciloscopia direta do escarro, pois foi e, certamente, continuará sendo o método mais importante e simples para a descoberta das fontes de infecção na comunidade.

Sinto-me à vontade para discorrer sobre o assunto baciloscopia. Acompanhei de perto, no Rio Grande do Sul, a aplicação do conceito de rede de baciloscopia da tuberculose, com controle de qualidade, e que em apoio ao Programa de Controle da Tuberculose do Rio Grande do Sul (PCT/RS) atingiu, a partir da década de 70 do século passado, o mais alto grau de proficiência e confiabilidade de resultados no País. Nesse sentido, quero manifestar meus respeitos a todos os profissionais que se dedicaram, ao longo de suas vidas, à implantação e qualificação do diagnóstico laboratorial da tuberculose.

Em especial, cumpre registrar e destacar o mestre dos mestres da bacteriologia da tuberculose brasileira, o saudoso professor e doutor Milton Fontes Magarão, com o qual tive o prazer de conviver na década de 70 em diversos momentos, tendo a oportunidade de conhecer suas qualidades profissionais e humanas, inclusive seu empenho, com corpo e alma, para a implantação da Rede de Laboratórios de Bacteriologia da Tuberculose no Brasil com seu próprio sistema de informação.

Nos dias de hoje, tendo eu o privilégio de ainda estar militando na área de tuberculose e de saúde pública, olho ao meu redor e vejo com muita alegria uma nova e entusiasmada geração de profissionais de laboratório na área da tuberculose, dando continuidade aos trabalhos de rotina e ampliando sua área de abrangência, de acordo com a nova realidade político-administrativa, o novo momento epidemiológico da tuberculose no Brasil e no mundo, bem como as novas tecnologias que o avanço da ciência, especialmente a biologia molecular, vem proporcionando.

Há consenso de que a baciloscopia do escarro continua essencial na luta contra a tuberculose, mas que na atualidade é insuficiente para fazer frente aos desafios postos pelo *M. tuberculosis*, especialmente pelo surgimento de cepas multirresistentes aos fármacos atualmente disponíveis e a modificação das formas e características de apresentação da tuberculose no hospedeiro, induzidas pela presença concomitante do vírus HIV, que potencializa a agressividade e o poder destrutivo das micobactérias.

O primeiro passo para a adoção de tecnologias mais avançadas é a ampla utilização do método da cultura dos bacilos no PNCT, o que possibilitará posteriores desdobramentos técnico-científicos mais sofisticados, como a tipificação dos bacilos e outros, quando indicados. As chances de que estes dois novos e grandes desafios, resistência bacilar e TB/AIDS, sejam vencidos são diretamente proporcionais à competência técnica dos profissionais, e principalmente à vontade política e à capacidade de organização e gerência dos gestores municipais, responsáveis diretos pelo controle da tuberculose em seu território desde a municipalização da saúde na década de 90.

Este Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, que é abrangente e de altíssimo padrão, contempla tanto os aspectos organizacionais, como os procedimentos técnicos com os respectivos materiais e equipamentos necessários à melhoria da qualidade dos serviços laboratoriais. É, portanto, uma ferramenta bem-vinda e imprescindível para que todos os laboratórios, públicos ou privados, possam atuar de forma uniforme e padronizada em todos os recantos desse imenso Brasil, para o êxito do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Ao mesmo tempo em que o Manual reitera a padronização do diagnóstico laboratorial da tuberculose pela “simples” baciloscopia do escarro, o título indica que o laboratório da tuberculose transcende o papel de realizar somente o diagnóstico clínico da doença para inserir-se no objetivo maior que é exercer vigilância epidemiológica sobre as várias formas da tuberculose, no sentido de monitorar o comportamento do bacilo e de seu aliado, o vírus da Aids, e sejam adotadas, em tempo oportuno, as medidas de intervenção pertinentes nas comunidades.

Werner Paul Ott

Tisiologista/Especialista em Saúde Pública
Membro do Comitê Técnico Assessor de Tuberculose da SVS/MS

Apresentação

Esta publicação apresenta algumas diretrizes gerais para a estruturação e funcionamento das atividades, em uma lógica hierarquizada e regionalizada. O objetivo é orientar os profissionais de laboratório do Sistema Único de Saúde (SUS) na organização da rede de referência para detectar casos de tuberculose pulmonar infecciosa, monitorar a evolução do tratamento e documentar a cura por meio do exame microscópico do escarro – baciloscopia. Além disso, este manual contribuirá para o diagnóstico dos casos de tuberculose pulmonar, baciloscopia negativa e extrapulmonar e detecção de outras micobactérias que afetam a saúde da população.

O estabelecimento de diretrizes para a organização da rede laboratorial é particularmente importante em termos de cuidado aos usuários, impacto na saúde e custos para o sistema de saúde. A organização desses serviços representa uma tarefa complexa, por exigir a combinação de tecnologias diversificadas e a sua adaptação às características locais, no que diz respeito aos aspectos sociodemográficos, epidemiológicos, sanitários, econômicos, entre outros. Assim, na organização da rede laboratorial é fundamental considerar: especificidades regionais, necessidade do Programa de Controle da Tuberculose, infra-estrutura existente, disponibilidade de recursos humanos, relação custo-benefício da incorporação tecnológica, critérios para otimização dos serviços, parâmetros de qualidade e legislação em vigor para instalação de laboratórios.

A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde se valeu da combinação dos conhecimentos teórico-práticos de profissionais que atuam na área de laboratório, como pesquisadores, técnicos de bancada e educadores, para elaboração desse manual, voltado para a melhoria da qualidade dos serviços prestados, dentro de critérios que privilegiam o aperfeiçoamento e a padronização dos métodos utilizados, a adequação aos requisitos de biossegurança e a organização da rede.

Gerson Oliveira Penna
Secretaria de Vigilância em Saúde

Equipe de elaboração

Esta publicação foi elaborada por um grupo de profissionais pesquisadores, técnicos de bancada e educadores dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos estados, Instituto Evandro Chagas, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia e Universidade Federal do Espírito Santo que atuam na área de laboratório para o controle da tuberculose, em parceria com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

Coordenação

Rosália Maia – CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Organização da Publicação

Rosália Maia – CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Susana Beatriz Vianna Jardim – CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Marta Osório Ribeiro – IPB/LACEN/RS – FEPPS

Daisy Nakamura Sato – IAL/Ribeirão Preto/SP

Fabiano Camilo e Silva – NUCOM/SVS/MS

Elaboração da publicação

Ana Lúcia Viana Atta Sarmento – LACEN/DF

Creusa Lima Campelo – LACEN/CE

Daisy Nakamura Sato – IAL/Ribeirão Preto/SP

Julia Ignez Salem – INPA/MCT

Lucilaine Ferrazoli – IAL/SP

Maria Luiza Lopes – IEC/SVS

Maria Madileuza Carneiro Neves – LACEN/PE “Dr. Milton Bezerra Sobral”

Marta Osório Ribeiro – IPB/LACEN/RS – FEPPS

Mauricio Morishi Ogusku – INPA/MCT

Moisés Palaci – Núcleo de Doenças Infecciosas – NDI/UFES

Rita Lecco Fioravanti – LACEN/ES

Rosália Maia – CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Solange A. Vinhas – Núcleo de Doenças Infecciosas – NDI/UFES

Susana Beatriz Vianna Jardim – CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Revisora técnica

Lucia Barrera – Servicio Micobacterias, INEI ANLIS Dr CG Malbran, Argentina. Laboratorio Supranacional OPS/OMS

Colaboradores

Angela Maria Werneck Barreto – CRPHF

Erica Chimara – IAL/SP

Eunice Atsuko Totumi Cunha – LACEN/MS

Francisco Duarte Vieira – LACEN/DF

Ludmila Baethgen – IPB/LACEN/RS – FEPPS

Ricardo Gadelha de Abreu – DEVEP/SVS/MS

Rosa Maria Albuquerque Castro – IPB/LACEN/RS – FEPPS

ORGANIZAÇÃO E GERÊNCIA DA REDE DE LABORATÓRIOS DE TUBERCULOSE

1.1 Introdução

Na construção de um Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), o objetivo principal dos serviços laboratoriais de diagnóstico de tuberculose deve ser o de detectar casos de tuberculose pulmonar, monitorar a evolução do tratamento e documentar a cura no fim do tratamento por meio do exame microscópico do escarro-baciloscopia.

A cultura pode complementar a baciloscopia permitindo colocar em evidência bacilos viáveis presentes em escassa quantidade. A cultura permite também a identificação das espécies e a realização do teste de sensibilidade.

A padronização das técnicas básicas de bacteriologia da tuberculose possibilita a comparação de resultados no país, facilita o treinamento de profissionais, a delegação de responsabilidades e a seleção de equipamentos, materiais e reagentes a serem adquiridos; facilita ainda a avaliação de desempenho da rede de laboratórios e o estabelecimento de uma supervisão apropriada para aumentar a eficiência e reduzir o custo operacional da rede. A padronização facilita também a instalação de novos laboratórios assim como a organização dos já instalados.

As técnicas e os procedimentos padronizados devem ser simples (para obter grande cobertura) e aplicáveis pelos auxiliares de laboratório. Ao mesmo tempo, sua sensibilidade e especificidade devem garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

A rede de laboratórios é muitas vezes negligenciada, apesar de ser um componente essencial para a estratégia do tratamento supervisionado (DOTS). Além disso, a epidemia de Aids e a emergência da tuberculose multirresistente têm demonstrado uma necessidade de investimento em garantia da qualidade e de biossegurança nos laboratórios de tuberculose¹.

Este capítulo tem o propósito de oferecer informações em administração e organização da rede de laboratórios de tuberculose, a partir da legislação brasileira e da literatura disponível, que orientem os gerentes e profissionais de laboratórios a:

- Desenvolver um sistema de rede de laboratórios, orientados pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS), que participem, em suas áreas de abrangência, do processo que se estende desde a detecção, o diagnóstico e o tratamento até a cura dos pacientes de TB.
- Assumir responsabilidade conjunta, com a gerência dos Programa de Controle da Tuberculose (PCT), ao programar, desenvolver e avaliar as atividades dos programas.
- Adotar as políticas dos PCT de maneira efetiva em suas áreas de abrangência, baseado em estratégias revisadas e recomendadas pela OMS e pela União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares (UICTDP) para o controle da TB².

1.2 Organização da rede nacional de laboratórios

O planejamento dos serviços de laboratórios deve ser orientado pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). Dessa forma, deve-se buscar garantir a universalidade e oportunidade de acesso dos cidadãos a todas as ações e serviços necessários à integralidade da atenção³.

A Lei Orgânica da Saúde, LOS 8.080/90, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde; a organização e o funcionamento dos serviços, diz em seu artigo 15 que a União, Estados, Distrito Federal e Municípios, em seu âmbito administrativo, têm as atribuições de: organização e coordenação do Sistema de Informação em Saúde; elaboração de normas técnicas e estabelecimento de padrões de qualidade; participação na formulação da política de formação de recursos humanos para a saúde; elaboração de normas para regular as atividades de serviços privados em saúde, tendo em vista a sua relevância pública; elaboração de normas técnico-científicas de promoção, proteção e recuperação da saúde entre outras.

Em seus artigos 16, 17 e 18, respectivamente, descreve as competências da:

- **Direção Nacional do SUS** de: definir e coordenar o sistema de rede de laboratórios de saúde pública; identificar os serviços estaduais e municipais de referência nacional para o estabelecimento de padrões técnicos de assistência a saúde; prestar cooperação técnica e financeira aos Estados, Distrito Federal e Municípios, para aperfeiçoamento de sua atuação institucional; elaborar normas para regular as relações entre o SUS e os serviços privados contratados de assistência à saúde; acompanhar, controlar e avaliar as ações e os serviços de saúde, respeitadas as competências Estaduais e Municipais; promover a descentralização para as Unidades Federadas e para os Municípios dos serviços e ações de saúde entre outras competências.
- **Direção Estadual do SUS** de: promover a descentralização, para os municípios, dos serviços e das ações em saúde; acompanhar, controlar e avaliar as redes hierarquizadas do SUS; prestar apoio técnico e financeiro aos Municípios e executar supletivamente ações e serviços de saúde; coordenar e, em caráter complementar, executar ações e serviços; identificar estabelecimentos hospitalares de referência e gerir sistemas públicos de alta complexidade, de referência estadual e regional; coordenar a rede estadual de laboratórios de saúde pública e gerir as unidades que permaneçam em sua organização administrativa; estabelecer normas, em caráter suplementar, para o controle e avaliação das ações e serviços de saúde, entre outras competências.
- **Direção Municipal do SUS** de: planejar, organizar, controlar e avaliar as ações e os serviços de saúde e gerir e executar os serviços públicos de saúde; participar do planejamento, programação e organização da rede regionalizada e hierarquizada

do SUS em articulação com sua Direção Estadual; gerir laboratórios públicos de saúde; controlar e fiscalizar os procedimentos dos serviços privados de saúde entre outras competências⁴.

De acordo com a Norma Operacional da Assistência em Saúde, NOAS 01/02, a implantação e o funcionamento articulado de estabelecimentos de saúde podem se dar no âmbito de um município, de uma microrregião ou região, dependendo da população de abrangência, das especificidades locais e dos níveis de complexidade dos serviços de laboratório. Dessa forma, deve-se garantir o encaminhamento para exames de maior complexidade, a serem ofertados, em alguns casos, nos laboratórios de referência estadual, regional ou até mesmo nacional⁵. De forma geral, propõe-se, com o objetivo de evitar o deslocamento dos usuários, um modelo organizacional que compreenda a estruturação de postos de coleta de amostras clínicas articulados a laboratórios de maior complexidade para a realização de exames⁶.

O Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SNLSP) foi instituído pela Portaria Ministerial 280, de 1977, ratificada pela LOS 8.080, de 1990.

O SNLSP foi reestruturado e então constituído o SISLAB, através da Portaria 15, em janeiro de 2002, ratificada pela Portaria 2.031 de setembro de 2004, como um conjunto de redes nacionais de laboratórios, organizadas em sub-redes, por agravo ou programas, de forma hierarquizada, por grau de complexidade das atividades relacionadas à vigilância em saúde – compreendendo a vigilância epidemiológica e vigilância em saúde ambiental, vigilância sanitária e assistência médica.

Em seu artigo 8º, a Portaria 2.031/2004 classifica as unidades laboratoriais do seguinte modo:

- I. Centros Colaboradores – CC.
- II. Laboratórios de Referência Nacional – LRN.
- III. Laboratórios de Referência Regional – LRR.
- IV. Laboratórios de Referência Estadual – LRE.
- V. Laboratórios de Referência Municipal – LRM.
- VI. Laboratórios Locais – LL.
- VII. Laboratórios de Fronteira – LF.

Os CC são unidades laboratoriais especializadas e capacitadas em áreas específicas, que apresentam os requisitos necessários para desenvolver atividades de maior complexidade e de ensino e pesquisa.

Os LRN são unidades laboratoriais de excelência técnica altamente especializada.

Os LRR são unidades laboratoriais capacitadas a desenvolver atividades mais complexas, organizadas por agravo ou programas, que prestam apoio técnico-operacional àquelas unidades definidas para sua área geográfica de abrangência.

Os LRE são os Laboratórios Centrais de Saúde Pública – LACEN, vinculados às secretarias estaduais de saúde e com área geográfica de abrangência estadual.

Os LRM são unidades laboratoriais vinculadas às secretarias municipais de saúde e com área geográfica de abrangência municipal.

Os LL são unidades laboratoriais que integram a rede estadual ou municipal de laboratórios de saúde pública.

Os LF são unidades laboratoriais localizadas em regiões de fronteira para a viabilização do diagnóstico de agentes etiológicos, vetores de doenças transmissíveis e outros agravos à saúde pública, bem como a promoção do controle analítico para a verificação da qualidade sanitária dos serviços prestados e de produtos⁷.

Em dezembro de 2004, a Portaria 70 da SVS, republicada em fevereiro de 2005 por incorreção da publicação de 2004, estabeleceu os critérios e a sistemática para habilitação de Laboratórios de Referência Nacional e Regional, para as Redes Nacionais de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde. Determinou, também, prazo para os Laboratórios de Referência Nacional e Regional, pré-selecionados pelas Portarias 409 e 410, de setembro de 2003, da Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, encaminharem documentação à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB, formalizando interesse em permanecer como Referência. Um dos requisitos para a habilitação é participar de Programa Internacional de Avaliação Externa de Qualidade para o LRN ou em Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade para o LRR. Os Laboratórios de Referência Nacional e Regional habilitados, passarão por processo de auditoria externa a cada 02 (dois) anos⁸.

Em dezembro de 2005, a Portaria Ministerial 2.606, classificou os LRE/LACEN por Nível e Porte, definindo, a partir daí, recursos a serem repassados mensalmente do Fundo Nacional de Saúde para os Fundos Estaduais de Saúde⁹.

Para a rede de laboratórios de tuberculose, as Portarias 409 e 410 – FUNASA indicaram o Laboratório de Referência Nacional do Centro de Referência Professor Hélio Fraga como pré-selecionado, o mesmo não acontecendo com Laboratórios de Referência Regional. O processo de habilitação dos laboratórios pré-selecionados está em andamento nesse momento.

1.3 Hierarquia na rede nacional de laboratórios de tuberculose

A organização dos serviços de laboratórios deve ser orientada pela diretriz da hierarquização, centralizando em laboratórios de referência (LR) procedimentos tais como a cultura, a identificação e o teste de sensibilidade em função da necessidade desses procedimentos exigirem recursos humanos, ambientais e materiais mais especializados. É necessário implementar um processo de descentralização das atividades para laboratórios de referência estadual e municipal bem como para laboratórios lo-

cais, quando o território é extenso como é o caso do Brasil. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em geral, um LL com microscopia pode realizar de 2 a 20 baciloskopias por dia e atender uma população de 100.000 habitantes e, é necessário ao menos um laboratório que realize cultura para uma área com população de 500.000 habitantes¹.

Para que todos os pacientes possam se beneficiar com a cultura para micobactérias e para que se possa garantir a qualidade da mesma é necessária a participação de toda a rede de laboratórios. Os LL que realizam bacilosopia devem manter um fluxo de referência e contra-referência sistemático com o LR mais próximo que realize cultura e teste de sensibilidade. Lembrando que as amostras clínicas devem ser enviadas o mais rápido possível para serem cultivadas, conforme as orientações descritas nos Capítulos 3 e 5 deste manual.

No item 1.9.1 do anexo deste capítulo, apresentamos um modelo de formulário para o envio de amostras clínicas ou isolados bacterianos para o LR. É possível que seja necessário coletar informações complementares em casos especiais que não sejam freqüentes na rotina de trabalho de LL ou LRM. Dessa forma, os estudos necessários para cada caso poderão ser realizados, utilizando-se da melhor forma possível os recursos de diagnósticos disponíveis no LR.

No capítulo 7 deste manual é descrito o Método de Ogawa-Kudoh como uma opção para o LRM ou LL que desejar realizar cultura para micobactérias e não possui todos os equipamentos recomendados para os outros métodos. Esse método é econômico e suficientemente sensível para assegurar que a cultura contribua para confirmar o diagnóstico da tuberculose pulmonar, nos casos com bacilosopia negativa e útil para recuperar os bacilos de escarros de pacientes bacilíferos que requerem teste de sensibilidade. Gera risco biológico similar ao da bacilosopia pois não requer centrifugação de suspensões com bacilos¹⁰. Em função disso, vem sendo utilizado em alguns estados do Brasil e em outros países da América Latina.

A utilização do método de Ogawa-Kudoh pelo LRM ou LL pode reduzir o tempo de espera do paciente pelo resultado do exame pois, se houver estufa bacteriológica no local, a cultura só será enviada ao LR se houver visualização de colônias. Nesse caso, deve ser estabelecido um fluxo referência e contra-referência sistemático com o LR mais próximo para o envio dos isolados bacterianos para identificação de espécie e/ou teste de sensibilidade.

Para que seja implantada cultura com todas suas etapas em um laboratório, existem alguns requisitos que devemos levar em consideração:

- Mais tempo gasto por amostra clínica pelo profissional.
- Treinamento em procedimentos de maior risco biológico.
- Medidas adicionais de proteção dos profissionais.

- Equipamentos específicos de maior custo, com garantia de manutenção.
- Laboratório mais espaçoso e com sistema de direcionamento e purificação de ar.

A qualidade dos meios de cultura específicos a serem utilizados em um laboratório é um ponto crítico. Para elaborá-los, é necessária uma infra-estrutura para preparação e para o controle de qualidade interno dos mesmos. Por essa razão, muitas vezes é necessário e/ou conveniente que os LRM ou LRE/LACEN produzam esses meios para sua rede de abrangência, assegurando seu transporte adequado e sua qualidade.

Os gestores nacionais, estaduais e municipais em parceria com os LRN, LRR, LRE/LACEN e LRM devem assegurar a qualidade da baciloscopia, cultura e teste de sensibilidade e garantir que a oferta e a utilização dos insumos, equipamentos e documentos técnicos sejam adequadas em todo país, de acordo com o plano de trabalho e objetivos dos PCT. As três esferas de governo, em parceria, de acordo com os princípios do SUS e respeitadas as competências descritas no item 4 deste capítulo, devem desenvolver as seguintes atividades:

- Publicar documentos técnicos e operacionais para a implementação dos procedimentos.
- Implementar um programa de formação de recursos humanos.
- Implementar um programa de garantia da qualidade.
- Promover o desenvolvimento das condições de biossegurança adequadas.

Os gestores devem verificar se a aplicação de recursos na implantação de novos métodos em um laboratório vai resultar na otimização do manejo dos casos da tuberculose. É importante, também, no momento de selecionar um método para utilização na rede de laboratório, conhecer quais são aceitos pelas normas da OMS¹⁰. É conveniente priorizar a implantação de métodos mais sofisticados, como os sistemas automatizados de cultura e teste de sensibilidade e métodos moleculares, em laboratórios com comprovada qualidade e que concentrem o diagnóstico de casos críticos de tuberculose (infantil, extrapulmonar, associada a infecção por HIV, multirresistente). Nesses laboratórios, algumas vezes, é possível processar os métodos mais caros somente nas amostras clínicas de pacientes que requerem prioritariamente rapidez na obtenção do resultado, e manter os procedimentos clássicos para as demais amostras clínicas.

O aumento de custo por amostra clínica analisada, originado pelo uso dos sistemas comerciais, em relação aos métodos clássicos, é variável mas sempre significativo. É maior para os laboratórios habituados a preparar seus próprios meios de cultura a base de ovos, para os que processam um baixo número de amostras clínicas e compram poucos tubos com meios semi-sintéticos e para os que estão longe dos centros urbanos.

Os laboratórios que não têm cabine de segurança biológica não devem processar métodos com centrifugação de amostras clínicas com baciloscopia positiva para

minimizar o risco biológico. Essas amostras são geralmente investigadas para identificar espécie e/ou conhecer sua sensibilidade a drogas antituberculose. Nesse caso, é conveniente enviar a amostra clínica, conforme descrito no Capítulo 5 deste manual, diretamente para o LR para a realização desses estudos.

A identificação das espécies de micobactérias é feita através das provas bioquímicas, mas pode ser também realizada por técnicas moleculares. Neste manual, no Capítulo 8, além das provas bioquímicas será descrito também um método molecular já utilizado em alguns LR no Brasil, o Método de PRA – hsp65 (do inglês *Polimerase Chain Reaction Restriction Analysis of the gene hsp65*).

Não se recomenda a incorporação de métodos que amplifiquem ácidos nucleicos em laboratórios que não apresentem os requisitos necessários para realizá-los (disponibilidade de três laboratórios separados, material descartável em cada laboratório, pessoal capacitado, roupa de uso exclusivo em distintas áreas, etc.)¹⁰.

1.3.1 Rede hierarquizada de execução de exames para o controle da tuberculose e outras micobactérias

Uma rede hierarquizada de execução dos exames para o controle da tuberculose e outras micobactérias deve ser orientada pela centralização, em laboratórios de referência (LR), de procedimentos tais como cultura, identificação e teste de sensibilidade em função da exigência de recursos humanos, ambientais e materiais mais especializados, conforme descrito detalhadamente no item 1.3 deste capítulo. No Quadro 1, apresentamos um resumo dos locais para execução de exames na rede hierarquizada de laboratórios do SUS para o diagnóstico e controle da tuberculose e outras micobactérias.

Quadro 1 Rede hierarquizada de execução de exames para o diagnóstico e controle da tuberculose e outras micobactérias

Laboratórios	Baciloscopia	Cultura (isolamento bacteriano)	Identificação do Complexo <i>M. tuberculosis</i>		Identificação de Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose		Teste de Sensibilidade	
			Identificação Fenotípica	Identificação Molecular	Identificação Fenotípica	Identificação Molecular	Drogas de 1ª Linha	Outras Drogas
LRN	x	x	x	x	x	x	x	x
LRR	x	x	x	x	x	x	x	x
LRE/LACEN	x	x	x				x	
LRM	x	x	x					
LF	x	x	x					
LL	x							

Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

1.4 Funções e competências do LRN, LRR, LRE/LACEN, LRM, LL e LF para o controle da tuberculose

O LRN é a unidade laboratorial de excelência técnica especializada e tem as seguintes competências:

- Assessorar a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), no acompanhamento, normalização, padronização de técnicas e avaliação das atividades dos laboratórios de tuberculose.
- Assessorar a CGLAB na coordenação técnica da rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Realizar procedimentos laboratoriais de maior complexidade.
- Assessorar a CGLAB na aquisição e distribuição de equipamentos e insumos estratégicos para a rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Coordenar o fornecimento e a produção de insumos (drogas antituberculose para o TS, fitas para a prova de niacina, meios de cultura, etc.) para a rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Promover, em parceria com a CGLAB e a rede de vigilância laboratorial da tuberculose, o desenvolvimento e avaliação de métodos, pesquisas operacionais e de vigilância epidemiológica de forma articulada com as sociedades técnico-científicas sem fins lucrativos e com centros de pesquisa e desenvolvimento, que reúnam competências e capacitações técnicas em áreas de interesse dos PCT.
- Assessorar a CGLAB na elaboração e promoção de um programa de educação continuada de recursos humanos para o desenvolvimento da credibilidade e confiabilidade laboratorial, estimulando parcerias com os laboratórios integrantes do SUS e com centros formadores de recursos, visando a melhoria da qualidade do diagnóstico laboratorial da tuberculose.
- Realizar assessoria e visitas técnicas aos LRR.
- Participar dos encontros, seminários e oficinas para elaboração de orçamentos, avaliação e programação das atividades da rede de vigilância laboratorial de interesse dos PCT.
- Participar da elaboração de protocolos do sistema de avaliação externa da qualidade para os testes de baciloscopia, cultura e teste de sensibilidade.
- Participar da realização das Avaliações Externas da Qualidade realizando os painéis de lâminas amostras e isolados bacterianos e, retestando amostras ou isolados bacterianos investigados nos laboratórios da rede, participar do comitê de análise dos resultados.
- Participar na elaboração e revisão de documentos técnicos relacionados à vigilância laboratorial da tuberculose.

- Disponibilizar, periodicamente, relatórios para a CGLAB das visitas técnicas realizadas.
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão à CGLAB com as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para tuberculose, obedecendo cronograma definido.
- Participar de intercâmbio e acordos nacionais e internacionais, visando, juntamente com a CGLAB, promover a melhoria do SUS.

Os LRR são unidades laboratoriais que prestam apoio técnico-operacional àquelas unidades definidas para sua área geográfica de abrangência com as seguintes competências:

- Assessorar, acompanhar e avaliar as atividades laboratoriais executadas nas unidades.
- Desenvolver e realizar técnicas de maior complexidade, bem como dar suporte técnico aos LRE/LACEN, promovendo as condições técnicas e operacionais na execução das ações.
- Assessorar o LRN no fornecimento e na produção de insumos (drogas antituberculose para o TS, fitas para a prova de niacina, meios de cultura, etc.) para a rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Desenvolver, em parceria com a CGLAB, o LRN e a rede de vigilância laboratorial da tuberculose, estudos, diagnósticos e pesquisas, de forma articulada com as sociedades técnico-científicas sem fins lucrativos e com centros de pesquisa e desenvolvimento, que reúnam competências e capacitações técnicas em áreas de interesse dos PCT.
- Assessorar a CGLAB na elaboração e promoção de um programa de educação continuada de recursos humanos para o desenvolvimento da credibilidade e confiabilidade laboratorial, estimulando parcerias com os laboratórios integrantes do SUS e com centro formadores de recursos, visando a melhoria da qualidade do diagnóstico laboratorial da tuberculose.
- Realizar visitas técnicas aos LRE/LACEN.
- Participar dos encontros, seminários e oficinas para avaliação e programação das atividades da rede de vigilância laboratorial de interesse dos PCT.
- Participar da elaboração de protocolos do sistema de avaliação externa da qualidade para os testes de baciloscopia, cultura e teste de sensibilidade.
- Participar da realização das Avaliações Externas da Qualidade.
- Participar na elaboração e revisão de documentos técnicos relacionados à vigilância laboratorial da tuberculose.
- Executar supletivamente exames laboratoriais de menor complexidade.

- Encaminhar ao LRN, conforme descrito nos Capítulos 3 e 5, as amostras para complementação do diagnóstico, isolados bacterianos inconclusivos ou que necessitam de identificação de espécie, bem como aqueles isolados que se destinam ao controle de qualidade.

ATENÇÃO: No item 1.9.1 dos anexos deste capítulo, apresentamos um modelo de formulário para o envio de amostras clínicas ou isolado bacteriano para o LR.

- Disponibilizar, periodicamente, relatórios para a CGLAB da visitas técnicas realizadas,
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão para a CGLAB com as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para tuberculose, obedecendo cronograma definido.

Os LRE/LACEN são os laboratórios com área geográfica de abrangência estadual com as seguintes competências:

- Coordenar a rede estadual de laboratórios públicos e privados que realizam a vigilância laboratorial de interesse dos PCT.
- Assessorar, acompanhar e avaliar as atividades laboratoriais executadas na rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Desenvolver e realizar técnicas de maior complexidade, bem como dar suporte técnico aos LRM, LL e LF, promovendo as condições técnicas e operacionais na execução das ações.
- Coordenar o fornecimento e a produção de insumos (fitas para a prova de niacina, meios de cultura, etc.) para a rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Assessorar a CGLAB na elaboração e promoção de um programa de educação continuada de recursos humanos para o desenvolvimento da credibilidade e confiabilidade laboratorial, estimulando parcerias com os laboratórios integrantes do SUS e com centros formadores de recursos, visando a melhoria da qualidade do diagnóstico laboratorial da tuberculose.
- Realizar visitas técnicas aos LRM, LL e LF.
- Participar dos encontros, seminários e oficinas para avaliação e programação das atividades da rede de vigilância laboratorial de interesse dos PCT.
- Participar da elaboração de protocolos do sistema de avaliação externa da qualidade para os testes de baciloscopia, cultura e teste de sensibilidade.
- Participar da realização das Avaliações Externas da Qualidade.
- Participar na elaboração e revisão de documentos técnicos relacionados à vigilância laboratorial da tuberculose.

- Executar supletiva e complementarmente exames de menor complexidade.
- Realizar procedimentos laboratoriais de maior complexidade.
- Encaminhar ao LRR, conforme descrito nos Capítulos 3 e 5, as amostras para complementação do diagnóstico, isolados bacterianos inconclusivos ou que necessitam identificação de espécie, bem como aqueles isolados que se destinam ao controle de qualidade.

ATENÇÃO: No item 1.9.1 do anexo deste capítulo, apresentamos um modelo de formulário para o envio de amostras clínicas ou isolado bacteriano para o LR.

- Realizar controle de qualidade da rede estadual.
- Habilitar, observada a legislação específica a ser definida pelos gestores nacionais da rede, os laboratórios que serão integrados à rede estadual, informando a CGLAB.
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios ao LRN, LRR e a CGLAB das visitas técnicas realizadas.
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão ao PCT e à CGLAB com as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para tuberculose, obedecendo cronograma definido.

Os LRM são unidades laboratoriais, com área geográfica de abrangência municipal, com as seguintes competências:

- Coordenar a rede municipal de laboratórios públicos e privados que realizam a vigilância laboratorial de interesse dos PCT.
- Assessorar, acompanhar e avaliar as atividades laboratoriais executadas na rede de vigilância laboratorial da tuberculose.
- Participar dos encontros, seminários e oficinas para avaliação e programação das atividades da rede de vigilância laboratorial de interesse dos PCT.
- Realizar visitas técnicas aos LL.
- Participar das Avaliações Externas da Qualidade.
- Realizar baciloscopia.

Obs.: No caso de municípios com de 500.000 habitantes ou mais, realizar além da baciloscopia, a cultura, buscando as condições descritas nos Capítulos 3 e 7, com o apoio técnico-operacional do LRE/LACEN.

- Encaminhar ao LRE/LACEN, conforme descrito nos Capítulos 3 e 5, as amostras para complementação do diagnóstico, isolados bacterianos inconclusivos ou que necessitam identificação de espécie e teste de sensibilidade, bem como as baciloskopias e os isolados que se destinam ao controle de qualidade.

ATENÇÃO: No item 1.9.1 do anexo deste capítulo, apresentamos um modelo de formulário para o envio de amostras clínicas ou isolado bacteriano para o LR.

- Habilitar, observada a legislação específica a ser definida pelos gestores nacionais da rede, os laboratórios que serão integrados à rede municipal, informando ao LRE/LACEN.
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios ao LRE/LACEN da visitas técnicas realizadas.
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão ao PCT e ao LRE/LACEN com as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para tuberculose, obedecendo cronograma definido.

Os LL são unidades laboratoriais que integram a rede estadual ou municipal de laboratórios que realizam exames de interesse dos PCT, com as seguintes competências:

- Coletar amostra para o diagnóstico, cultura e teste de sensibilidade para tuberculose, respeitando sua capacidade técnica instalada.
- Realizar baciloscopia.
- Participar das Avaliações Externas da Qualidade.
- Encaminhar ao respectivo LRM ou ao LRE/LACEN, conforme descrito nos Capítulos 3 e 5, as amostras para complementação do diagnóstico, cultura e teste de sensibilidade e as baciloscopias que se destinam ao controle de qualidade.

ATENÇÃO: No item 1.9.1 do anexo deste capítulo, apresentamos um modelo de formulário para o envio de amostras clínicas ou isolado bacteriano para o LR.

- Disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão ao LRM com as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para tuberculose, obedecendo cronograma definido.

Os LF são unidades laboratoriais com as seguintes competências:

- Participar das Avaliações Externas da Qualidade.
- Realizar baciloscopia e cultura.
- Encaminhar ao LRE/LACEN as amostras, conforme descrito nos Capítulos 3 e 5, para complementação do diagnóstico, isolados bacterianos inconclusivos ou que necessitam de identificação de espécie e teste de sensibilidade, bem como as baciloscopias e os isolados que se destinam ao controle de qualidade.

ATENÇÃO: No item 1.9.1 do anexo deste capítulo, apresentamos um modelo de formulário para o envio de amostras clínicas ou isolado bacteriano para o LR.

- Auxiliar nas atividades desenvolvidas pelos LRE/LACEN.
- Colaborar no cumprimento dos Acordos Internacionais, na área de prevenção e controle da tuberculose.
- Disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão ao LRE/LACEN com as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para tuberculose, obedecendo cronograma definido^{1, 7, 10}.

1.5 Capacitação, visita técnica

Uma das metas do PNCT é aumentar o número dos sintomáticos respiratórios (SR) examinados através da baciloscopia ou cultura. Sabe-se que para o cumprimento dessa meta é necessário investimento constante na qualificação dos serviços laboratoriais e na capacitação de recursos humanos (RH), de modo a ampliar a capacidade de diagnóstico e intensificar a busca de SR.

1.5.1 Capacitação

Profissionais capacitados e motivados são fundamentais para o adequado desempenho do laboratório. É crucial também que eles estejam conscientes do papel que desempenham para que possam ser parceiros no controle da tuberculose.

No Brasil, a CGLAB, em conjunto com o PNCT, tem realizado cursos e oficinas, com o objetivo de capacitar e sensibilizar os profissionais de laboratório para a utilização de indicadores na análise dos dados laboratoriais gerados. A avaliação é um processo crítico-reflexivo, contínuo e sistemático e esse processo, se desenvolvido integrado às práticas do cotidiano dos serviços, fortalece a integração otimizando o uso dos recursos públicos. A avaliação pode ser usada, também, como ferramenta para a tomada de decisão no âmbito da gestão.

1.5.1.1 Capacitação para os LL

As capacitações técnicas voltadas para os LL devem abordar a relevância da baciloscopia para o diagnóstico e o controle de tratamento da tuberculose, noções de sistema métrico para que possam utilizar adequadamente os equipamentos, noções de biossegurança e de qualidade; além dos conceitos de assepsia e esterilização. Os profissionais devem receber ainda orientação para:

- Forma de transmissão da doença.
- Coleta, armazenamento e transporte das amostras clínicas.

- Baciloscopia direta: preparação do esfregaço, inclusive numeração da lâmina e escolha da partícula purulenta do escarro; fixação; coloração, descoloração e coloração de fundo pelo método de Ziehl-Neelsen.
- Procedimentos para o Controle de Qualidade Interno da Baciloscopia.
- Uso do microscópio para a leitura microscópica.
- Emissão do resultado no formulário de **Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia** e registro dos dados no **Registro de Baciloscopia**. Modelos destes formulários são apresentados, respectivamente, nos itens 1.9.2 e 1.9.3 dos anexos desse capítulo.

ATENÇÃO: O resultado da baciloscopia deve ser emitido no máximo em 24 horas.

- Manutenção de microscópio.
- Limpeza e conservação das lâminas para o Controle de Qualidade Externo.
- Procedimentos de envio ao LRE/LACEN das amostras para complementação do diagnóstico, cultura e teste de sensibilidade, bem como as baciloscopias que se destinam ao controle de qualidade.
- Procedimento de desinfecção e esterilização de material contaminado.
- Medidas de segurança para a manipulação de escarro.
- Identificação de problemas que possam ocorrer durante a realização e leitura da baciloscopia.
- Planejamento e controle de estoque dos insumos e reagentes do laboratório.

Os cursos para os LL devem ser organizados e conduzidos pelo LRE/LACEN, em parceria com o LRM (quando houver), para no máximo 10 profissionais por curso¹. O suporte financeiro e técnico deve ser dos gestores estaduais e nacionais e dos LRR e LRN. O número de treinandos deve ser calculado com base no espaço do laboratório, nos insumos a serem utilizados e nos microscópios disponíveis. Em média, é necessário um microscópio para cada dois treinandos¹. O conteúdo teórico deve ser ministrado pelo LRE/LACEN em parceria com o PCT e com o LRM, quando houver.

1.5.1.2 Capacitação para os LF

As capacitações técnicas voltadas para os LF devem abordar a relevância da baciloscopia para o diagnóstico e o controle de tratamento da tuberculose, noções de sistema métrico para que possam utilizar adequadamente os equipamentos, noções de biossegurança e de qualidade; além dos conceitos de assepsia e esterilização. Os profissionais devem receber ainda orientação para:

- Forma de transmissão da doença.

- Coleta, armazenamento e transporte das amostras clínicas.
- Baciloscopia direta: preparação do esfregaço, inclusive numeração da lâmina e escolha da partícula purulenta do escarro; fixação; coloração, descoloração e coloração de fundo pelo método de Ziehl-Neelsen.
- Baciloscopia após concentração da amostra clínica.
- Cultura e identificação do Complexo *M. tuberculosis*
- Procedimentos de controle de qualidade interno.
- Uso e manutenção dos equipamentos.
- Uso do microscópio para a leitura microscópica.
- Emissão do resultado no formulário de **Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia** e registro dos dados no **Registro de Baciloscopia**. Modelos desses formulários são apresentados, respectivamente, nos itens 1.9.2 e 1.9.3 dos anexos desse capítulo.
- Emissão do resultado no formulário de **Solicitação e Resultado de Exame – Cultura de Teste de sensibilidade** e registro dos dados no **Registro de Cultura e Teste de Sensibilidade**. Modelos destes formulários são apresentados, respectivamente, nos itens 1.9.4 e 1.9.5 dos anexos desse capítulo.
- Manutenção de microscópio.
- Limpeza e conservação das lâminas para o Controle de Qualidade Externo.
- Procedimentos de envio ao LRE/LACEN das amostras para complementação do diagnóstico, isolados bacteriológicos inconclusivos ou que necessitam de identificação de espécie, bem como as baciloscopias e os isolados que se destinam ao controle de qualidade.
- Procedimento de desinfecção e esterilização de material contaminado.
- Medidas de segurança para a manipulação de escarro.
- Identificação de problemas que possam ocorrer durante a realização e leitura da baciloscopia.
- Planejamento e controle de estoque dos insumos e reagentes do laboratório.
- Preparação dos reagentes para o método de Ziehl-Neelsen.
- Preparação dos reagentes para todas etapas da cultura.
- Preparação de meios de cultura.
- Biossegurança.

Os cursos para os LF devem ser organizados e conduzidos pelo LRE/LACEN em parceria com o LRM (quando houver), para no máximo 10 profissionais por curso¹. O suporte financeiro e técnico deve ser dos gestores estaduais e nacionais, e dos LRR e LRN. O número de treinandos deve ser calculado com base no espaço do laboratório, nos insumos a serem utilizados e nos microscópios disponíveis. Em média, é necessário um microscópio para cada dois treinandos¹. O conteúdo teórico deve ser ministrado pelo LRE/LACEN em parceria com o PCT e com o LRM, quando houver.

1.5.1.3 Capacitação para os LRE/LACEN e LRM

As capacitações voltadas para o LRE/LACEN e LRM devem atender as necessidades técnicas e dar suporte para o execução das funções de coordenadores de rede.

O conteúdo do curso deve cobrir:

- Informação sobre normas e princípios do SUS, PCT, estratégia do tratamento supervisionado.
- Funções da rede de laboratórios de tuberculose: emissão de relatórios, protocolo de visita técnica, protocolo de Controle de Qualidade Interno e Externo.

Metodologia técnica:

- 1) Métodos de Execução do Esfregaço para Baciloscopia Direta e Baciloscopia após Concentração da Amostra Clínica.
- 2) Baciloscopia corada pelo Método da Fluorescência com Auramina O, como método alternativo e se o laboratório já possui microscópio de fluorescência.
- 3) Cultura para micobactérias.
- 4) Identificação do Complexo *M. tuberculosis*.
- 5) Preparação de reagentes, corantes e meios de cultura.
- 6) Procedimento para o Controle de Qualidade Interno.
- 7) Uso e Manutenção de Equipamentos.
- 8) Biossegurança.
- 9) Avaliação Externa da Qualidade.

Metodologia técnica específica para LRE/LACEN:

- 1) Teste de sensibilidade.
- 2) Preparação de reagentes e meios de cultura para o teste de sensibilidade pelo método das proporções.

Conteúdo de gerência:

- 1) Organização do treinamento em Baciloscopia direta corada pelo método de Ziehl-Neelsen.
- 2) Roteiro da visita técnica aos LL e LF; e ao LRM (quando for o caso).
- 3) Programa de Controle Externo da Qualidade da Baciloscopia.
- 4) Organização do fluxo de lâminas para o controle de qualidade, amostras clínicas e isolados bacterianos.
- 5) Planejamento, aquisição e controle de insumos, reagentes e equipamentos.

A CGLAB em parceria com o PNCT, LRN e LRR devem organizar e ministrar os cursos para os LRE/LACEN e LRM. Esses cursos devem ter a duração de três ou mais semanas¹.

1.5.1.4 Capacitação para os LRN e LRR

Os LRN e LRR devem receber conteúdo sobre assessoria técnica, planejamento e gerência de rede de laboratórios, além de conteúdo teórico-prático em métodos para execução de testes de sensibilidade, vigilância laboratorial, identificação de micobactérias, avaliação de atividades laboratoriais e metodologia para pesquisa operacional. Eles podem ser capacitados dentro do país ou em cursos internacionais promovidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ou pela União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares (UICTDP).

1.5.2 Visita técnica

A visita técnica consiste no processo mais adequado para observar as condições de um laboratório e as atividades técnicas nele desenvolvidas. Por ter um contato direto, é mais efetivo e permite propor ações corretivas de acordo com os recursos e possibilidades locais. É imprescindível que as visitas técnicas sejam realizadas de forma programada, regular, periódica e que disponham de apoio e de recursos financeiros dos gestores. Durante a visita, o avaliador deverá observar detalhadamente documentos, condições técnicas, operacionais e de biossegurança.

Essa atividade deve ser realizada durante o período de trabalho especialmente quando há mudanças de recursos humanos, de procedimentos, de local ou de equipamento. A visita técnica permite a coleta de dados para o Programa de Controle Externo da Qualidade da Baciloscopia da Tuberculose e melhora o fluxo de informação entre os laboratórios.

Recomenda-se como rotina uma visita anual e, se necessário, uma frequência maior.

O avaliador deve preparar e manter uma lista de verificação de requisitos operacionais, técnicos e de indicadores fundamentais durante a visita técnica.

Lista de verificação operacional

- Avaliar condições de infra-estrutura.
- Verificar se a norma de prazo para emissão dos resultados (especialmente os casos positivos) está sendo seguida.
- Verificar se as lâminas estão guardadas apropriadamente para o controle externo de qualidade.
- Verificar se a equipe técnica foi capacitada para as técnicas específicas.
- Avaliar a carga de trabalho em relação à disponibilidade de profissionais.
- Verificar e avaliar a quantidade de baciloscopias realizadas e a proporção de lâminas positivas.
- Verificar e avaliar a quantidade de culturas, pacientes investigados, quantidade de cultura para diagnóstico.

- Verificar e avaliar isolados bacterianos enviados para teste de sensibilidade.
- Verificar se os casos positivos notificados pelo laboratório constam dos registros da unidade de tratamento.
- Verificar também os seguintes requisitos:
 - Possuir POP das técnicas e manuais de laboratório.
 - Possuir insumos em quantidade e qualidade adequadas.
 - Possuir um planejamento para compra de insumos necessários.
 - Possuir equipamentos (microscópio) em funcionamento apropriado.
 - Possuir um sistema de controle de qualidade interno.
 - Possuir normas de biossegurança.
 - Possuir controle de saúde periódico dos profissionais.
 - Possuir registro de acidentes de trabalho.
 - Possuir e manter registros dos exames padronizados.
 - Possuir requisição de exame padronizada.

Lista de verificação técnica

- Observar e avaliar os processos de preparação de esfregaço, coloração e leitura.
- Assegurar que sejam feitos os controles de qualidade dos corantes.
- Fazer releitura de algumas lâminas com o profissional do local, para avaliar a qualidade do esfregaço, da coloração e da leitura.
- Revisar os resultados anteriores do CEQ por releitura, discutir sugestões e recomendações para a melhoria da qualidade.

Lista de verificação de indicadores fundamentais

- Quantas amostras foram realizadas por sintomático respiratório.
- Qual a positividade da baciloscopia diagnóstica.
- Qual o percentual de sintomáticos respiratórios com baciloscopia positiva.
- Qual a positividade da baciloscopia total.
- Qual o percentual de amostras com aspecto de saliva.

1.6 Administração laboratorial e manutenção de registros

Um sistema de registro laboratorial fornece informações que podem ser utilizadas para melhorar a gerência dos PCT em todas as esferas de governo. A manutenção de registros dos materiais recebidos (amostras clínicas, isolados bacterianos ou lâminas de baciloscopia), dos procedimentos laboratoriais, dos resultados de exames e dos materiais enviados (amostras clínicas, isolados bacterianos ou lâminas de baciloscopia) para os LR para realização de cultura, identificação de espécie, teste de sensibilidade e controle de qualidade, é essencial para o planejamento das estratégias a serem utilizadas para o controle da doença. A padronização desses registros deve ser

simples, prática e limitada às informações essenciais para facilitar a coleta, a compilação e avaliação das informações.

O laboratório deve possuir programa de manutenção preventiva para os equipamentos necessários à realização dos exames, que atenda as recomendações dos fabricantes e deve, também, possuir programa aprovado e implantado de calibração/validação dos equipamentos e instrumentos de medição. Esses programas devem estar documentados e disponíveis.

1.6.1 Procedimentos Operacionais Padrão (POP)

Todos os protocolos dos procedimentos de laboratório usados rotineiramente devem ter sido publicados anteriormente em livro, manual ou periódico confiável e, todos, devem ser mantidos na bancada para serem consultados facilmente. Os procedimentos devem ser escritos exatamente como realizados no laboratório e qualquer mudança deve ser conhecida e utilizada primeiramente pelo LR¹.

ATENÇÃO: Os métodos apresentados neste manual devem ser utilizados pelos laboratórios da rede, de acordo com o Quadro 1 desse capítulo e sua capacidade técnica instalada. Os métodos a serem utilizados pelos laboratórios devem ser pactuados com os coordenadores da rede estadual e/ou nacional para um planejamento adequado do suporte técnico-financeiro.

O laboratório deve ter instruções documentadas e disponíveis:

- Para coleta, acondicionamento, conservação e transporte de amostras clínicas e isolados bacterianos.
- Com critérios para aceitação e rejeição de amostras clínicas e de isolados bacterianos encaminhados.
- Para o uso e manutenção de todos os equipamentos. Essas instruções devem estar aos lado do equipamento e devem ser claras para que todo profissional possa operá-los.
- De biossegurança relacionados com os processos de limpeza e desinfecção de superfícies e gerenciamento de resíduos.
- Para o caso de acidente com risco biológico.

1.6.2 Formulários de laboratório

O formulário de solicitação e resultado de exame deve ser legível e com informações suficientes para a identificação do laboratório, do solicitante, do paciente, da amostra e dos métodos utilizados. Deve conter também datas (coleta, entrada no

laboratório, da realização dos ensaios e da emissão do laudo), nome e assinatura dos responsáveis por sua emissão.

Os formulários de solicitação e resultado de baciloscopia, cultura e teste de sensibilidade; do controle de qualidade interno e externo; ou qualquer outro formulário utilizado na rede de laboratórios deve ser padronizado; os modelos estão disponíveis nos anexos dos capítulos deste manual.

1.6.3 Registros laboratoriais

Alguns registros merecem atenção especial do responsável pelo laboratório, especialmente os registros nos:

- Sistema de informação com cadastramento unívoco das amostras clínicas e isolados bacteriano que garanta sua identificação e rastreabilidade durante toda a sua permanência no laboratório. A CGLAB, em parceria com o DATASUS, vem desenvolvendo o sistema informatizado Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL, especialmente para as doenças de interesse da saúde coletiva como a tuberculose, com o objetivo de agilizar o fluxo de informações. No item 1.9.7 deste capítulo apresentamos a Requisição de Exames do Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL.
- Registro das manutenções corretivas e preventivas realizadas em todos os equipamentos do laboratório.
- Livro de acidentes laboratoriais.

Este último deve ser mantido pelo responsável do laboratório e deve conter detalhes sobre os acidentes e as medidas necessárias tomadas. Cada acidente de laboratório deve ser relatado ao responsável do laboratório e todos os detalhes registrados, anotando os seguintes dados:

- Data do acidente.
- Nome da pessoa acidentada e de todas as pessoas presentes no laboratório no momento do acidente.
- Descrição do acidente.
- Número do registro da amostra clínica/isolado bacteriano envolvido.
- Extensão do ferimento.
- Acompanhamento das medidas tomadas após a realização dos exames na pessoa acidentada.

O responsável do laboratório e a pessoa acidentada devem assinar o registro no livro¹.

1.7 Monitoramento da saúde dos profissionais

A transmissão da tuberculose é um risco reconhecido para os profissionais de laboratório e a infecção pelo vírus do HIV facilita essa transmissão. A maioria das pessoas não desenvolve a doença depois da infecção, desde que elas sejam imuno-competentes.

Para o estabelecimento de uma infecção suficiente para produzir doença, a exposição deve ser próxima e prolongada. Alguns fatores como: higienização deficiente e negligência com as medidas de segurança, quando presentes no laboratório, aumentam a probabilidade da transmissão da infecção, enquanto fatores que afetam a imunidade do indivíduo (por exemplo: HIV, diabetes, câncer, uso abusivo de álcool) aumentam a probabilidade o desenvolvimento da doença.

Os profissionais do laboratório de tuberculose devem ser selecionados cuidadosamente. Eles devem ser mental e psiquicamente capazes¹. Devem aderir as medidas de segurança e ser acompanhados por um programa de vigilância pelo qual seu *status* de saúde é monitorado regularmente.

1.7.1 Programa de monitoramento de doenças para profissionais de laboratório

Cada profissional deve ter um arquivo confidencial de monitoramento de doença no qual os procedimentos de triagem para tuberculose, tanto quanto de outras doenças, devem ser registrados. Os elementos de um programa de monitoramento de doença incluem o seguinte:

1.7.1.1 Perfil pré-admissão e linha de base na admissão dos profissionais de laboratório

Um questionário padrão de saúde deve ser preenchido para cada profissional. Esse questionário deve relatar infecção ou doença prévia de tuberculose, *status* da vacinação pela BCG, fatores de saúde que podem comprometer a susceptibilidade à tuberculose e contato prévio com caso confirmado de tuberculose. Um modelo de questionário é apresentado no item 1.9.6 dos anexos deste capítulo.

Para a linha de base deve ser realizado um raio X de tórax e uma Reação de Mantoux - RM também conhecida como Teste Tuberculínico ou PPD. Se o resultado da RM for: forte reator, com enduração > 15 mm e, o profissional apresentar sintomas sugestivos de tuberculose, ele deve ser avaliado clínica e microbiologicamente. Devem ser coletadas duas amostras de escarro em dias sucessivos e investigados por baciloscopia e/ou cultura para tuberculose.

O teste para HIV confidencial com aconselhamento (pré e pós-teste) deve ser oferecido para todos os profissionais do laboratório. Não é recomendada a revacinação com BCG como prevenção para tuberculose nos profissionais de laboratório¹.

1.7.1.2 Monitoramento trimestral de saúde

Os profissionais de laboratório devem declarar, trimestralmente, as informações de seu *status* de saúde em um formulário que contenha perguntas específicas relacionadas aos sinais e sintomas de tuberculose. Isso inclui tosse por mais de três semanas, perda de peso, anorexia, suores noturnos e outros episódios de infecção respiratória nas últimas semanas.

O peso dos profissionais também deve ser registrado trimestralmente e, se houver uma perda maior do que 10% sem motivo conhecido, com relação ao trimestre anterior, deverá ser realizada uma investigação clínica e microbiológica para tuberculose.

Um modelo **Monitoramento Trimestral de Saúde** é apresentado no item 1.9.6 dos Anexos deste capítulo e poderá ser utilizado como monitoramento trimestral do estado de saúde dos profissionais de laboratório.

1.7.1.3 Monitoramento de pós-exposição

Após um acidente no laboratório, o monitoramento trimestral deve ser alterado. O profissional deve ser monitorado clinicamente. Oito semanas depois da exposição, um raio X de tórax deve ser realizado. Junto deve ser realizada uma RM nos casos onde a RM realizada na linha de base tenha apresentado uma enduração com diâmetro < 10 mm.

1.8 Referências

1. WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part I. Organization and Management*. WHO/TB/98.258. Geneva, Switzerland. 1998.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Gerência de Rede de Laboratórios de TB*. Brasília. 2004
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Assistência à Saúde. Departamento de Descentralização da Gestão da Assistência. *Manual de Apoio aos Gestores do SUS – Organização da Rede de Laboratórios Clínicos*. Brasília. 2002.
4. BRASIL. Lei Orgânica da Saúde, LOS 8080. Brasília. 1990
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Assistência à Saúde. *Norma Operacional de Assistência a Saúde – NOAS*. Brasília. 2002.
6. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria da Assistência à Saúde, Departamento de Descentralização da Gestão da Assistência. *Posto de Coleta*. Brasília. 2002.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria 2031 – Gabinete Ministerial*. Brasília 2004.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Portaria 70*. Brasília. 2004.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria 2606 – Gabinete Ministerial*. Brasília. 2005.
10. OPAS/Organizacion Panamericana de la Salud. *Draft de Normas Para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis Parte II*. Cultivo. Argentina. 2007.

1.9 Anexos do capítulo

1.9.1 Formulário para o envio de amostras clínicas ou isolado bacteriano para o LR



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário para o Envio de Amostras Clínicas ou Isolados Bacterianos para o LR

A informação solicitada neste formulário é a mínima necessária para o LR manter contato com o laboratório que enviou a amostra clínica ou cultura e ter condições de escolher a metodologia mais adequada a ser utilizada no isolamento ou na identificação da espécie ou no teste de sensibilidade. A falta de informação pode levar a não utilização da metodologia adequada para o caso em questão e com isso aumentar o tempo de emissão do resultado.

PROCEDÊNCIA					
Instituição:			Número do CNES:		
Endereço:			Telefone/Fax:		
Nome do Paciente:			Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino		
Profissão:					
Data de Nascimento: ____/____/____	Idade atual: ____	Procedência do Paciente: ☐ Ambulatório ☐ Hospital ☐ Consultório			
DADOS CLÍNICOS DO PACIENTE					
Teste ID com PPD (Mantoux): ☐ Reator Forte ☐ Reator Fraco ☐ Não Reator ☐ Não Realizado					
☐ Paciente com Tratamento Prévio para TB			☐ Paciente sem Tratamento Prévio para TB		
TRATAMENTO PRÉVIO PARA TB					
Esquema	Ano	Desfecho			
		☐ Cura	☐ Abandono	☐ Recidiva	☐ Falência
		☐ Cura	☐ Abandono	☐ Recidiva	☐ Falência
		☐ Cura	☐ Abandono	☐ Recidiva	☐ Falência
FATORES PRÉ-DISPONENTES PARA MICOBACTERIOSES					
Doença pulmonar obstrutiva e/ou destrutiva: ☐ micose curada ☐ tuberculose curada ☐ bronquite crônica ☐ pneumoconiose ☐ doença maligna ☐ sílicose ☐ bronquiectasia ☐ fibrose cística					
Estado de imunodeficiência: ☐ doença maligna ☐ diabetes ☐ uso de drogas imunossupressoras					
HIV/Aids: ☐ positivo ☐ negativo ☐ sem informação					
Doença esofageana com regurgitação: ☐ sim ☐ não					
Utilização de procedimentos invasivos: ☐ prótese/implante ☐ diálise ☐ transplante ☐ injeções e/ou punções repetidas					

Resumo da doença:

MATERIAL ENVIADO☐ Amostra clínica. Qual:☐ Cultura. A partir de qual amostra clínica:

O resultado da baciloscopia da amostra clínica foi:

Número de culturas realizadas:

Número de cultura positivas:

1ª cultura foi realizada em meio de cultura: _____.

Houve desenvolvimento de _____ colônias em _____ dias de incubação, com desenvolvimento de pigmento

☐ sim☐ não.

2ª cultura foi realizada em meio de cultura: _____.

Houve desenvolvimento de _____ colônias em _____ dias de incubação, com desenvolvimento de pigmento

☐ sim☐ não.

3ª cultura foi realizada em meio de cultura: _____.

Houve desenvolvimento de _____ colônias em _____ dias de incubação, com desenvolvimento de pigmento

☐ sim☐ não.

Data:

_____/_____/_____

Assinatura do Responsável pelo envio:

1.9.2 Formulário de solicitação e resultado de exame – baciloscopia



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia

Data de Entrada no Laboratório: ____/____/____		Número do CNES:	Nº Geral:
Unidade de Saúde:			Telefone: ()
Nome do Paciente:		Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino	
Data de Nascimento: ____/____/____	Idade atual: ____	Nome da mãe:	
Número do Cartão SUS:			
Endereço completo:			
Bairro:	Município:	CEP:	Telefone: ()
Procedência do Paciente: ☐ Ambulatório ☐ Hospital ☐ Consultório			Nº Prontuário:
Data da Coleta:	Amostra: ☐ Escarro espontâneo ☐ Escarro induzido ☐ Outras Qual?		
SOLICITAÇÃO – BACILOSCOPIA			
Diagnóstico ☐ 1ª Amostra ☐ 2ª Amostra		Controle de Tratamento ☐ 1º mês ☐ 2º mês ☐ 3º mês ☐ 4º mês ☐ 5º mês ☐ 6º mês ☐ ____ mês	
Data de solicitação:	Nome do solicitante	Assinatura do solicitante	
RESULTADO – BACILOSCOPIA			
Laboratório Executor:			Nº do Exame:
Data de Entrada no Laboratório: ____/____/____		Data da realização do Exames: ____/____/____	
Metodo de Ziehl Neelsen ☐ Negativa ☐ de 1 a 9 bacilos ☐ Positiva (+) ☐ Positiva (++) ☐ Positiva (+++) ☐ Não realizada			
Aspecto do Escarro: ☐ Saliva ☐ Mucopurulento ☐ Sanguinolento ☐ Liquefeito			
Observações:			
Nome do responsável pelo exame:			
Data: ____/____/____		Assinatura do Responsável pelo Exame:	

1.9.3 Registro de bacilosopia



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Registro de Bacilosopia

Número:	Data Entrada:		Data da Coleta da Amostra:	
Nome:				
Endereço:	Data nascimento:		Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino	
Material:	Diagnóstico:		Solicitante:	
☐ Escarro ☐ Outro:	☐ 1ª Amostra ☐ 2ª Amostra ☐ ___ Amostra			
Controle de tratamento:				
☐ 1º mês ☐ 2º mês ☐ 3º mês ☐ 4º mês ☐ ___ mês	Aspecto do escarro: ☐ Saliva ☐ Mucopurulento ☐ Sanguinolento ☐ Liquefeito			
Bacilosopia pelo Método de:				
☐ Ziehl-Neelsen ☐ Outro: Qual:	Corantes: Fucsina- Lote:		Azul de metileno-Lote:	Álcool-ácido – Lote:
BACILOSCOPIA RESULTADO				
☐ Negativa	☐ de 1 a 9 bacilos ☐ Positiva (+)	☐ Positiva (++)	☐ Não realizada	Observações:
Data:	Nome do responsável pelo exame: Assinatura			

Número:	Data Entrada:		Data da Coleta da Amostra:	
Nome:				
Endereço:	Data nascimento:		Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino	
Material:	Diagnóstico:		Solicitante:	
☐ Escarro ☐ Outro:	☐ 1ª Amostra ☐ 2ª Amostra ☐ ___ Amostra			
Controle de tratamento:				
☐ 1º mês ☐ 2º mês ☐ 3º mês ☐ 4º mês ☐ ___ mês	Aspecto do escarro: ☐ Saliva ☐ Mucopurulento ☐ Sanguinolento ☐ Liquefeito			
Bacilosopia pelo Método de:				
☐ Ziehl-Neelsen ☐ Outro: Qual:	Corantes: Fucsina- Lote:		Azul de metileno-Lote:	Álcool-ácido – Lote:
BACILOSCOPIA RESULTADO				
☐ Negativa	☐ de 1 a 9 bacilos ☐ Positiva (+)	☐ Positiva (++)	☐ Não realizada	Observações:
Data:	Nome do responsável pelo exame: Assinatura			

1.9.4 Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias



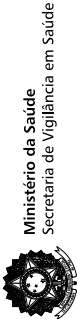
Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Solicitação e Resultado de Exame – Cultura para Micobactérias

Data de Entrada no Laboratório: _____/_____/_____		Nº CNES		Nº Geral:	
Unidade de Saúde:				Telefone:	
Nome do Paciente:				Gênero: ☐ Masculino ☐ Feminino	
Data de Nascimento: _____/_____/_____		Idade atual: _____	Nome da mãe:		
Número do Cartão SUS:					
Endereço completo:					
Bairro:		Município:		CEP:	Telefone:
Procedência do Paciente: ☐ Ambulatório ☐ Hospital			Nº Prontuário		
☐ Paciente com Tratamento Prévio para TB			☐ Paciente sem Tratamento Prévio para TB		
GRUPO DE VULNERABILIDADE					
☐ Dependente de Alcool	☐ Diabético	☐ Presidiário	☐ Usuário de Drogas IV	☐ Portador de Fibrose Cística	☐ Portador de SIDA/Aids
☐ Portador de outra Imunodeficiência Qual:					
AMOSTRA CLÍNICA					
☐ Escarro espontâneo	☐ Escarro induzido	☐ Outra _____		Via de Obtenção: _____	
Aspecto do Escarro: ☐ Saliva ☐ Mucopurulento ☐ Sanguinolento ☐ Liquefeito					
Data da Coleta: _____/_____/_____			Nº de amostras:		
SOLICITAÇÃO – CULTURA					
☐ Investigação Diagnóstica	☐ Controle de Tratamento	☐ Identificação da Espécie		☐ Teste de Sensibilidade	
☐ 1ª Amostra	☐ 2ª Amostra	☐ 1º mês	☐ 2º mês	☐ 3º mês	☐ 4º mês
		☐ 5º mês	☐ 6º mês	☐ ____ mês	
Critério para Teste de Sensibilidade: ☐ Falência ☐ Abandono ☐ Recidiva ☐ Co-infecção					
☐ Contato com TB Resistente					
Responsável:		Instituição:		Telefone: ()	

RESULTADO – CULTURA				
Laboratório Executor:		Data da Realização do Exame: _____/_____/_____		
Cultura pelo método:				
☐ Convencional em LJ		☐ Convencional Ogawa-Kudoh		☐ Automatizado
☐ Semi-automatizado				
Cultura:				
☐ Negativa	☐ Contaminada	☐ Não Realizada	☐ Positiva	
Identificação da Espécie pelo método:				
☐ Fenotípico		☐ Molecular		
Resultado Preliminar da Identificação pelo Método Fenotípico				
☐ Houve crescimento de colônias sugestivas do Complexo M. tuberculosis				
☐ Houve crescimento de colônias sugestivas de Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT)				
☐ Teste de sensibilidade em andamento		☐ Identificação conclusiva em andamento		
Resultado da Identificação da Espécie: <i>Mycobacterium</i> _____				
Teste de Sensibilidade às Drogas pelo método:				
☐ Proporções		☐ Por outro método. Qual:		
Drogas	Isoniazida	Rifampicina	Etambutol	Estreptomicina
RESULTADO				
Legenda drogas: Isoniazida=I=INH; Rifampicina=R=RMP; Etambutol=E=EMB; Estreptomicina=S=SM Legenda Resultado: Sensível=S; Resistente=R				
Teste de Sensibilidade Não Realizado:				
☐ Cultura Inviável	☐ Cultura Contaminada	☐ Exame Solicitado fora dos critérios	☐ Teste Realizado com outra Cepa num Período Inferior a 3 meses	
Observações:				
Data: ____/____/____		Nome do Responsável pelo Exame:		Assinatura:

1.9.5 Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade



Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade

Número LACEN:		Data Entrada LACEN:		Data da Coleta da Amostra:	
Nome:		Data nascimento:		Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino	
End:					
Material:		Amostra: ☐ 1ª ☐ 2ª ☐ Controle		Solicitante: ☐ VT ☐ Não VT	
Aspecto do Escarro: ☐ Saliva ☐ Mucopurulento ☐ Sanguinolento ☐ Liquefeito				Obs.: ☐ HIV + ☐ HIV -	
Bacilosopia:					
Cultura: Lote dos meios:		OK / LJ		OK / LJ	
1ª semana data:				data: Observações	
2ª semana data:				data:	
3ª semana data:				data:	
4ª semana data:				data:	
Cultura pelo Método:					
☐ Convencional - LJ		☐ Convencional OK		☐ Automatizado	
Identificação:		Data da Realização:		Identificação:	
☐ Fenotípica ☐ Molecular				Niacina: PNB:	
Teste Sensibilidade: lote dos meios:		data semeadura:		data leitura: Obs:	
Nº de colônias: ☐ sensível		☐ resistente		Nº de colônias: ☐ sensível ☐ resistente	
Erambutol (EMB)		Nº de colônias: ☐ sensível		No. de colônias: ☐ sensível ☐ resistente	
Obs.:					
Data da Emissão do Resultado:		Nome do responsável pelo exame:		Assinatura:	

1.9.6 Questionário de saúde dos profissionais do laboratório de tuberculose

Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Questionário de Saúde dos Profissionais do Laboratório de Tuberculose

[illegible]

Monitoramento Trimestral de Saúde						
Primeiro Trimestre						
Tosse por mais de 3 semanas	☐ Não ☐ Sim	Dor no Peito ☐ Não	☐ Sim	Letargia ☐ Não	☐ Sim	Outras doenças
Perda de peso	☐ Não ☐ Sim	Anorexia ☐ Não	☐ Sim	Suores Noturno ☐ Não	☐ Sim	Data
						Peso
						Kg
Segundo Trimestre						
Tosse por mais de 3 semanas	☐ Não ☐ Sim	Dor no Peito ☐ Não	☐ Sim	Letargia ☐ Não	☐ Sim	Outras doenças
Perda de peso	☐ Não ☐ Sim	Anorexia ☐ Não	☐ Sim	Suores Noturno ☐ Não	☐ Sim	Data
						Peso
						Kg
Terceiro Trimestre						
Tosse por mais de 3 semanas	☐ Não ☐ Sim	Dor no Peito ☐ Não	☐ Sim	Letargia ☐ Não	☐ Sim	Outras doenças
Perda de peso	☐ Não ☐ Sim	Anorexia ☐ Não	☐ Sim	Suores Noturno ☐ Não	☐ Sim	Data
						Peso
						Kg
Quarto Trimestre						
Tosse por mais de 3 semanas	☐ Não ☐ Sim	Dor no Peito ☐ Não	☐ Sim	Letargia ☐ Não	☐ Sim	Outras doenças
Perda de peso	☐ Não ☐ Sim	Anorexia ☐ Não	☐ Sim	Suores Noturno ☐ Não	☐ Sim	Data
						Peso
						Kg

1.9.7 Requisição de exames do sistema gerenciador de ambiente laboratorial – GAL



República Federativa do Brasil
Ministério da Saúde

Gerenciador de Ambiente Laboratorial

Requisição de Exame

Requisição	1 Unidade de Saúde (ou outra fonte)*		CNES	
	2 UF*	3 Município de Atendimento*		Código IBGE
	4 Nome do Profissional de Saúde*		Registro Profissional/Matrícula	5 Assinatura
Paciente	6 Nome do Paciente*		7 Data de Nascimento*	
	8 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	9 Sexo* M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	10 Gestante 1 - 1º Trimestre 2 - 2º Trimestre 3 - 3º Trimestre 4 - Idade gestacional ignorada 5 - Não 6 - Não se aplica 9 - Ignorado	
	11 Número do Cartão SUS		12 Nome da Mãe	
	13 Logradouro (rua, avenida, ...)		14 Complemento (apto, casa, ...)	
	15 Número	16 Ponto de Referência	17 Bairro	
	18 UF*	19 Município de Residência*		Código IBGE
	20 CEP	21 DDD Telefone	22 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	23 País (se residente fora do Brasil)*
	24 Data de Solicitação*	25 Data dos Primeiros Sintomas*	26 Caso* 1 - Suspeito 2 - Comunicante 3 - Acompanhamento 9 - Ignorado	27 Tratamento 1 - Dia 2 - Semana 3 - Mês 4 - Ano 9 - Ignorado
	28 Etapa de Tratamento 1 - Pré 2 - Tratamento 3 - Re-tratamento 4 - Avaliação de resistência 9 - Ignorado		29 O paciente tomou vacina? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	30 Data da última dose ministrada
	Amostra/Exame	31 Exame Solicitado*	32 Material Enviado*	33 Amostra* (1ª, 2ª, 3ª, 4ª)
			35 Usou antibiótico antes da data da coleta? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
			1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
			1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
			1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
SINAN	36 Agravado/Doença*		CID 10*	37 Nº Notificação SINAN*
	38 Unidade de Saúde Notificante*		CNES*	
	39 UF*	40 Município de Notificação*		Código IBGE*
Dados Complementares	Dados Clínicos/Laboratoriais			

**Gerenciador de Ambiente Laboratorial - GAL
INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO**

FICHA DE REQUISIÇÃO DE EXAME

Campo	Descrição
01	Nome completo e sem abreviações da Unidade de Saúde ou outra fonte que solicita exame (s) a rede de laboratórios ou número do Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde – CNES. CAMPO OBRIGATÓRIO
02	Sigla da Unidade de Federação da Unidade de Saúde ou outra fonte responsável pela solicitação de exame (s). CAMPO OBRIGATÓRIO
03	Nome do município de atendimento da Unidade de Saúde ou outra fonte responsável pela solicitação de exame (s) ou o código do IBGE correspondente. CAMPO OBRIGATÓRIO
04	Nome completo do profissional de saúde responsável pela solicitação de exame (s) e número do registro profissional ou matrícula. CAMPO OBRIGATÓRIO
05	Assinatura do profissional de saúde responsável pela solicitação de exame (s).
06	Nome completo e sem abreviação do paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
07	Data de nascimento do paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
08	Idade do paciente. Este campo deve ser preenchido somente se a data de nascimento for desconhecida (Ex. 10 dias = 10 D; 3 meses = 3 M; 26 anos = 26 A). Se o paciente não souber informar sua idade, anotar a idade aparente.
09	Sexo do paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
10	Situação gestacional. Sendo o paciente do sexo feminino, informar o período gestacional em que a paciente se encontra no momento da ocorrência do agravo/doença. Sendo o paciente do sexo masculino, informar a opção 6 – não se aplica.
11	Número do Cartão Nacional de Saúde. Caso o paciente possua, informar o número do Cartão SUS.
12	Nome completo e sem abreviações da mãe do paciente.
13	Logradouro (Rua, Avenida) de residência do paciente.
14	Dados complementares, por exemplo, apartamento, casa, da residência do paciente.
15	Número (apartamento, casa) da residência do paciente.
16	Ponto de Referência para auxiliar na localização da residência do paciente.
17	Bairro de residência do paciente.
18	Unidade de Federação de residência do paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
19	Município de residência do paciente ou código do IBGE correspondente. CAMPO OBRIGATÓRIO
20	CEP – Código de endereçamento postal do logradouro (avenida, rua, travessa, etc) - da residência do paciente.
21	Telefone para contato com o paciente, com DDD.
22	Classificação da zona de residência do paciente.
23	País de residência do paciente. Se residente fora do Brasil preenchimento do CAMPO OBRIGATÓRIO
24	Data da solicitação do exame (s). CAMPO OBRIGATÓRIO
25	Data dos primeiros sintomas – data que surgiram os primeiros sintomas no paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
26	Classificação da definição de caso. Suspeito – Diagnóstico; Comunicante; Acompanhamento – Controle ou Ignorado. CAMPO OBRIGATÓRIO
27	Tratamento – tempo de tratamento que o paciente encontra-se na data da solicitação do exame (s). Preenchimento em número + orientação de Dia, Semana, Mês, Ano, por exemplo: 12 D corresponde a 12 dias, 3 M que corresponde em 3º mês. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASO DE ACOMPANHAMENTO
28	Etapa de Tratamento – corresponde à etapa em que o paciente encontra-se na data da solicitação do exame (s) podendo ser: Pré - sem tratamento; Tratamento – sob medicação; Re-tratamento – iniciado novamente o tratamento ou troca de esquema de tratamento; Avaliação de resistência – paciente com resultados laboratoriais sugestivo de resistência. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASO DE ACOMPANHAMENTO
29	Após verificar documentação/caderneta, se o paciente já foi vacinado contra o agravo/doença suspeito ou confirmado conforme solicitação de exame (s).
30	Informar a data da última dose da vacina contra agravo/doença suspeita ou confirmado que o paciente tomou. ex: 20/10/2007.
31	Informar o (s) exame (s) laboratorial (is) solicitado (s) para paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
32	Informar o (s) tipo (s) de material (is) enviado (s) para o (s) exame (s) solicitado (s) para o paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
33	Informar o número da (s) amostra (s) coletada (s) para o paciente. CAMPO OBRIGATÓRIO
34	Informar a data em que a (s) amostra (s) foi (ram) coletada (s). CAMPO OBRIGATÓRIO
35	Informar se o paciente na data de coleta usou antibiótico ou medicação.
36	Informar o nome do agravo/doença ou código correspondente estabelecido pelo SINAN (CID 10) que foi notificado. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASOS JÁ NOTIFICADOS
37	Preencher o número da notificação atribuído pela unidade de saúde ou outra fonte para identificação do caso no SINAN. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASOS JÁ NOTIFICADOS
38	Informar no campo de data da notificação a data de preenchimento da ficha de notificação SINAN. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASOS JÁ NOTIFICADOS
39	Nome completo da Unidade de Saúde, ou outra fonte que realizou a notificação e o código correspondente ao Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde – CNES. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASOS JÁ NOTIFICADOS
40	Sigla da Unidade de Federação da Unidade de Saúde ou outra fonte que realizou a notificação no SINAN. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASOS JÁ NOTIFICADOS
41	Nome completo do município onde está localizada a unidade de saúde ou outra fonte notificadora que realizou a notificação ou código do IBGE. PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO PARA CASOS JÁ NOTIFICADOS
42	Dados complementares informar dados clínicos/ laboratoriais adicionais que auxiliaram no diagnóstico laboratorial.

SISTEMA DE GARANTIA DA QUALIDADE DA BACILOSCOPIA

Siglas e definições

- **BAAR** – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- **FN** – Falso Negativo (s)
- **FP** – Falso Positivo (s)
- **AL** – Amostragem de Lote
- **PCEQB** – Programa de Controle Externo da Qualidade da Baciloscopia
- **LR** – Laboratório de Referência
- **LRN** – Laboratório de Referência Nacional
- **LRR** – Laboratório de Referência Regional
- **LRE/LACEN** - Laboratório de Referência Estadual/Laboratório Central de Saúde Pública
- **LRRE** – Laboratório de Referência Regional dos Estados
- **LL** – Laboratório Local
- **LF** – Laboratório de Fronteira
- **Laboratório Local:** Laboratórios que realizam a baciloscopia e atendem a uma área geográfica definida
- **Laboratório Avaliador (LA):** Laboratório que realizará a releitura das lâminas dos laboratórios locais de sua área de abrangência
- **Sistema de Controle de Qualidade por Amostragem de Lote:** sistema de controle de qualidade por amostragem das lâminas de baciloscopia baseado na produção total trimestral de lâminas por um laboratório em particular e na prevalência estimada de lâminas positivas
- **Teste de Proficiência (TP)** – Historicamente cada organização tem definido TP diferentemente
 - **União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares (UICTDP)** – TP é a avaliação do desempenho do laboratório pela comparação de resultados a partir de diferentes laboratórios. A UICTDP define que a AEQ é uma expansão do teste de proficiência
 - **Organização Mundial de Saúde (OMS)** – TP é o processo de envio de lâminas a partir do LR para o LL
 - **International Organization for Standardization (ISO)** – TP é a determinação do desempenho do laboratório por meio de comparações de testes inter-laboratoriais
- **Releitura de Lâminas** – É a análise, por parte do LA, das lâminas dos laboratórios locais encaminhadas como parte do PCEQB. Este manual recomenda que a releitura seja sempre cega
- **Taxa de Positividade** – Proporção de lâminas positivas encontradas em um laboratório entre todas as lâminas examinadas (diagnóstico e controle), em um período de tempo definido

- **Erro Maior** – Este tipo de erro é considerado o mais crítico e tem um potencial alto de impacto no manejo do paciente e pode resultar no diagnóstico incorreto ou no manejo impróprio do paciente. Um erro maior pode indicar deficiência técnica grosseira¹

Um erro maior pode ser por FP e FN:

- **Erro Maior FP** – É quando uma lâmina negativa é confundida com uma lâmina positiva +, ++ e +++¹
- **Erro Maior FN** – É quando uma lâmina positiva +, ++ ou +++ é confundida com uma lâmina negativa¹
- **Erro Menor** – Na prática clínica este erro pode ter algum impacto no manejo do paciente. Entretanto para a proposta de avaliação do desempenho do laboratório, este tipo de erro é considerado irrelevante, por causa das limitações inerentes na detecção de bacilos em materiais paucibacilares que podem não estar distribuídos igualmente na lâmina. Entretanto, freqüentes erros menores podem indicar deficiências¹

2.1 Descrição

O Sistema de Garantia da Qualidade (SGQ), segundo recomendações do Consenso Global publicado pela Association of Public Health Laboratories (APHL), Center for Disease Control and Prevention (CDC), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Royal Netherlands Tuberculosis (KNCV), Research Institute of Tuberculosis, Japan (RIT) and World Health Organization (WHO) em 2002, é projetado para melhorar continuamente a confiabilidade e a eficácia dos serviços de laboratório. Em relação à bacteriologia da TB, deve ser um sistema com o objetivo de alcançar a qualidade técnica necessária ao diagnóstico laboratorial, fortalecendo conhecimentos, desenvolvendo capacidade técnica e estimulando uma atitude responsável frente ao trabalho, não devendo de maneira nenhuma ser confundido com inspeção ou fiscalização.

Para alcançar esse objetivo, é importante a organização de uma rede de laboratórios com capacidade de planejar e implementar tais atividades de SGQ. No Brasil, a rede de laboratórios para o diagnóstico da tuberculose é composta do LRN, LRR, LRE/LACEN, LRRE, LL e LF, conforme descrito no Capítulo 1.

O estabelecimento do SGQ requer uma sequência de atividades, tais como planejamento, avaliação da situação, identificação das falhas que devem ser corrigidas de forma prioritária, estabelecimento de um programa de treinamento e suporte técnico desenhado para corrigir estas falhas medindo o impacto do sistema. Os resultados de cada sequência de atividade orientarão o desenho de um novo ciclo, sendo, portanto, um processo iterativo.

Uma avaliação pontual, em geral, é pouco esclarecedora e limitada, podendo ser somente o reflexo de um acerto ou erro fortuito, de um momento de organização ou desorganização do laboratório, do bom ou mau funcionamento do equipamento. O SGQ deve produzir resultados periódicos que permitam avaliar a tendência ao longo do tempo dos parâmetros que qualificam a qualidade de trabalho. Os processos e análises do SGQ requerem aplicação de um método científico e cada novo método deve ser validado antes de ser adotado. Diferentes estratégias têm sido propostas para o controle dos métodos, podendo ser utilizadas combinadas ou separadas em distintos momentos ou diferentes regiões segundo as possibilidades que existam e as informações que se deseja obter.

O SGQ é basicamente um processo educativo e motivador cujo êxito se baseia na aceitação pelos integrantes da equipe de saúde de sua responsabilidade frente à comunidade, e está destinado a manter e aperfeiçoar a qualidade técnica e operativa.

Um Programa de Garantia da Qualidade de Baciloscopia leva a identificar os erros mais frequentes, descrever os procedimentos e controles que minimizam a probabilidade de produzir falsos resultados ou baixos rendimentos dos métodos bacteriológicos e a elevar a qualidade do diagnóstico².

O SGQ é composto por três métodos:

- **Controle de Qualidade Interno (CQI)** – Também chamado Supervisão Interna (SI), abrange todos os meios pelos quais o laboratório de baciloscopia da TB controla a operação, incluindo verificação de instrumentos e de reagentes/soluções de coloração em estoque.
- **Melhoria de Qualidade (MQ)** – Processo pelo qual os componentes dos serviços de diagnóstico de baciloscopia são analisados com o objetivo de procurar alternativas para remover possíveis obstáculos e causas de erro. Coleta de dados, análise de dados e solução criativa de problemas são os componentes-chave desse processo. Envolve monitoramento contínuo e identificação de defeitos, seguidos por ação de reforço, incluindo treinamento quando necessário, para evitar a recorrência de problemas. MQ frequentemente depende de visitas efetivas de avaliação.
- **Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)** – Trata-se de um processo que permite que os laboratórios participantes avaliem suas capacidades pela comparação dos seus resultados aos de outros laboratórios da rede (laboratório central e intermediário). Esse processo pode abranger os seguintes métodos: (i) Teste de Proficiência executado através de exame de painéis contendo esfregaços baciloscópicos; (ii) releitura cega dos esfregaços baciloscópicos por um LR; (iii) visita técnica executada pelo LR para revisar a qualidade de desempenho dos laboratórios sob jurisdição.

2.2 Controle de Qualidade Interno (CQI)

Essa estratégia de controle é interna porque é feita dentro do próprio laboratório que deve estabelecer, na sua rotina de trabalho, um sistema de controle regular e registrar os resultados decorrentes desses controles. O responsável técnico deve realizar uma revisão periódica dos pontos críticos e monitorar os resultados com objetivo de evitar ou minimizar erros técnicos. O CQI do laboratório de diagnóstico da tuberculose envolve dois aspectos:

Preventivos: comuns a todos os laboratórios, também conhecidos como Boas Práticas de Laboratório (BPL) englobam medidas a serem adotadas desde a recepção das amostras, realização dos esfregaços, coloração, leitura microscópica até a emissão do laudo final.

Operacional: inclui o controle de insumos, equipamentos, procedimentos técnicos, monitoramento dos resultados de exames, registro técnico dos procedimentos de CQI e aplicação de ações corretivas quando estas se fizerem necessárias³.

2.2.1 CQI dos insumos

A qualidade da baciloscopia está também relacionada ao controle de estoque. Esse controle deve garantir a disponibilidade de todo o material de consumo necessário à execução dos exames e monitorar o aspecto físico e prazo de validade dos reagentes, corantes e outros materiais, para evitar desperdícios.

2.2.1.1 Água

Em alguns locais, a água corrente, mesmo deionizada, pode estar contaminada com micobactérias ambientais, que podem gerar resultados falsos positivos. Se a água da torneira ou a água purificada aparecer turva ou suja, deve ser feita uma investigação microbiológica buscando a presença de micobactérias ambientais.

Nos anexos deste capítulo, item 2.9.1, é apresentado um modelo de registro para o CQI da água utilizada no laboratório.

A) Procedimentos para detecção de microorganismos álcool-ácido resistentes na água.

1. Centrifugar 200 – 250 ml da água em múltiplos tubos.
2. Fazer um esfregaço com uma mistura dos sedimentos.
3. Fixar, corar pelo Método de Ziehl-Neelsen e realizar a leitura do esfregaço conforme descrito no Capítulo 6 deste manual.

ATENÇÃO: As fórmulas e o modo de preparo dos corantes e reagentes utilizados no Método de Ziehl-Neelsen estão descritos nos anexos do Capítulo 6; e os formulários para o controle da preparação dos corantes e reagentes estão descritos nos anexos deste capítulo.

Resultado

- Presença de microorganismos álcool-ácido resistentes.
Ação corretiva: Investigar a causa da contaminação. Esterilizar todo o conteúdo da água e descartar conforme descrito no Capítulo 3 deste manual.
- Ausência de microorganismos álcool-ácido resistentes.
Ação: Esterilizar todo o conteúdo da água e descartar conforme descrito no Capítulo 3 deste manual.

B) Procedimento para isolamento de micobactérias na água.

1. Filtrar 1000 ml da água através de um filtro membrana estéril com poros de 0,22 µm.
2. Cortar o filtro em tiras com bisturi estéril.

3. Colocar a tira num meio de cultura LJ⁴.
4. Registrar, incubar e realizar a leitura da cultura conforme descrito no Capítulo 7.

ATENÇÃO: As fórmulas e o modo de preparo dos meios de cultura e reagentes para a cultura das tiras do filtro, assim como os formulários para o controle da preparação desses meios de cultura e reagentes estão descritos nos Anexos do Capítulo 7.

Resultado

- Cultura negativa.
Ação: Esterilizar todo o conteúdo da água e descartar conforme descrito no Capítulo 3 deste manual.
- Cultura positiva.
Ação corretiva: Investigar a causa da contaminação. Esterilizar todo o conteúdo da água e descartar conforme descrito no Capítulo 3 deste manual.

2.2.1.2 Corantes

Verificar a qualidade dos corantes toda vez que produzir um lote e, quando estiver em uso, verificar pelo menos uma vez por semana. O CQI do lote dos corantes consiste em corar um esfregaço preparado e fixado com uma amostra de resultado conhecido positivo e outro com uma amostra negativa. Esses esfregaços podem ser preparados no laboratório a partir de amostras tratadas com 10 gotas de fenol a 5% durante uma hora. Os esfregaços devem ser conservados ao abrigo do calor e da umidade, em caixas plásticas conforme descrito no item 2.4.2 deste Capítulo. Os procedimentos para a verificação da qualidade dos corantes estão descritos no item 2.2.2 deste capítulo. A validade dos corantes é de 6 meses.

2.2.1.3 Lâminas

Devem ser sem uso, limpas e desgorduradas, conforme descrito no Capítulo 6.

2.2.1.4 Equipamentos

Os equipamentos devem ser utilizados de acordo com as recomendações do fabricante, a fim de ampliar a sua vida útil. Devem, também, ser monitorados pelo usuário para assegurar a precisão requerida para a análise, conforme descrito no Capítulo 11.

2.2.2 CQI dos procedimentos técnicos da baciloscopia

Recomenda-se a realização do controle diário dos procedimentos técnicos, levando-se em conta os detalhes que mais freqüentemente podem ser as causas de erros

na execução técnica. No Quadro 1 são apresentadas as causas mais comuns de erros, as prováveis consequências e medidas preventivas a serem tomadas.

Quadro 1 Causas mais comuns de erros na baciloscopia, prováveis consequências e medidas preventivas/corretivas

CAUSAS DE ERROS	PROVÁVEIS CONSEQUÊNCIAS	MEDIDAS PREVENTIVAS
Reutilização de potes de amostra (resíduo de escarro positivo)	Resultado falso positivo	Fornecer gratuitamente pote descartável. Jamais reutilizar os potes de coleta
Coleta inadequada da amostra para diagnóstico: quantidade muito pequena ou saliva	Resultado falso negativo	Orientar adequadamente o paciente para coletar a amostra
Amostras em temperatura ambiente por mais de 24h; mantidas refrigeradas por mais de 7 dias; exposta à luz solar	Resultado falso negativo	Seguir rigorosamente as orientações e os tempos para armazenar, conservar e enviar a amostra
Identificação da amostra: nome incompleto ou ilegível ou nome e nº na tampa do pote	Troca de amostra e de resultados dos pacientes	Escrever com letra legível o nome completo do paciente e o nº da amostra no corpo do pote
Lâminas com arranhões e/ou resíduos	Resultado falso positivo	Utilizar lâminas sem uso, desengorduradas e sem arranhões. Jamais reutilizar lâminas
Preparo de esfregaços com: pouca iluminação; muitas amostras ao mesmo tempo; lâmina colocada longe da amostra	Troca de amostra e de resultados dos pacientes	Manter a área bem iluminada e preparar no máximo 12 esfregaços de cada vez; conferir o nº da lâmina e da amostra
Utilização da porção não purulenta do escarro; esfregaço com pouca amostra	Resultado falso negativo	Utilizar a porção mais purulenta do escarro; colocar quantidade adequada de amostra para preparar o esfregaço
Aquecimento excessivo na fixação; tempo menor de aquecimento da fucsina; descoloração excessiva; corantes impróprios para uso	Resultado falso negativo	Seguir rigorosamente os tempos indicados nos procedimentos; fazer controle de qualidade
Fucsina sem filtrar; aquecimento demasiado do esfregaço na coloração	Resultado falso positivo (cristais de fucsina confundidos com BAAR)	Filtrar os corantes na hora do uso; seguir rigorosamente os procedimentos
Descoloração insuficiente do esfregaço	Resultado falso positivo (bacilos saprófitos corados de vermelho confundidos com BAAR).	Seguir rigorosamente os procedimentos
Lente de imersão ou frasco conta-gotas do óleo com resíduos de esfregaço positivo	Resultado falso positivo (visualização de bacilos de outros esfregaços)	Limpar a lente de imersão após a leitura de cada esfregaço positivo. Cuidar para que o frasco conta-gotas não toque no esfregaço
Sobreposição e diminuição do número de campos lidos	Resultado falso negativo	Ler de forma padronizada, seguindo rigorosamente os procedimentos
Microscópio sem condições adequadas de uso/manutenção; presença de fungos nas lentes (embaçamento)	Resultado falso negativo	Providenciar manutenção preventiva semestral. Limpar o microscópio diariamente

Fonte: Ministério da Saúde. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. 2001

Os aspectos operacionais do CQI dos procedimentos técnicos de coloração da baciloscopia consistem na inclusão diária de esfregaços de amostras clínicas com resultado conhecido para verificar se a coloração está de acordo com o esperado.

Selecionar amostras de escarro da sua rotina com resultados conhecidos de acordo com os seguintes critérios:

- **CQI positivo:** amostras com resultado positivo ++ ou +++ para BAAR.
- **CQI negativo:** amostras negativas para BAAR.

Os esfregaços para o CQI da baciloscopia devem ser realizados de acordo com os seguintes procedimentos:

1. Identificar várias lâminas como CQI positivo e várias como CQI negativo.
2. Preparar e fixar os esfregaços.

Colocar e conservar os esfregaços para CQI em uma caixa porta-lâminas, identificar a caixa com uma etiqueta com os dados: CQI positivos e negativos, data de preparação, prazo de validade (3 meses) e símbolo de risco biológico. Conservar em lugar fresco e ao abrigo da luz.

Após a produção de um lote de corantes, realizar uma coloração, conforme descrito no Capítulo 6 deste manual, com um CQI positivo e um CQI negativo para verificar o desempenho dos corantes frente a esfregaços com resultado conhecido.

Procedimentos de leitura dos esfregaços do CQI na verificação da qualidade do lote:

1. Ler o CQI positivo e o negativo, conforme descrito no Capítulo 6 deste manual.
2. Interpretar os resultados dos CQI, de acordo com as seguintes possibilidades:
 - CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de vermelho e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, como o esperado. Nesse caso, o lote de corantes está validado.
 - CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. Nesse caso, todo o lote está invalidado e deve ser descartado.

Realizar uma vez por semana a coloração de uma lâmina com esfregaço CQI positivo e uma com CQI negativo, juntamente com os esfregaços das amostras da rotina, conforme descrito no Capítulo 6 deste manual.

Procedimentos de leitura dos esfregaços no dia da realização do CQI da coloração:

1. Ler o CQI positivo e o negativo, conforme descrito no Capítulo 6, antes de ler as lâminas dos pacientes.
2. Interpretar os resultados dos CQI, de acordo com as seguintes possibilidades:
 - CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de vermelho e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, como o esperado. Nesse caso, a rotina está validada e pode-se realizar a leitura das lâminas dos pacientes e liberar os resultados.
 - CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. Nesse caso, toda a rotina está invalidada e será preciso fazer novamente a bacilos-

cópia de todas as amostras e analisar quais as possíveis causas de erro (ver quadro 1).

Recomenda-se que, nos laboratórios que possuam mais de um técnico, todas as lâminas positivas no dia de sua execução sejam revisadas pelo outro técnico, a fim de minimizar os erros oriundos do processo de leitura ou registro de resultado do exame.

2.3 Melhoria da Qualidade (MQ)

A Melhoria da Qualidade é uma atividade permanente e depende da conscientização e atitude dos profissionais envolvidos em cada etapa do trabalho, entre os quais pode se destacar:

- Organização do local de trabalho
- Capacitação periódica dos profissionais
- Uso de procedimentos operacionais padrão (POP)
- Cuidados quanto a inspeção, identificação, conservação e transporte de amostras
- Manutenção de equipamentos
- Padronização da leitura, análise, registro, emissão e entrega de resultados
- Registro dos problemas e dificuldades observadas durante a realização das atividades laboratoriais e das medidas corretivas adotadas. Esse registro deve estar disponível para todos os profissionais envolvidos com o trabalho

2.4 Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

Trata-se de um processo que permite que os laboratórios participantes avaliem suas capacidades técnicas, através da comparação dos resultados dos seus exames aos de outros, dentro de uma rede hierarquizada de laboratórios. Esse processo pode ser constituído de três mecanismos:

1. Teste de Proficiência executado através de exame de painéis contendo esfregaços baciloscópicos.
2. Releitura dos esfregaços baciloscópicos realizados nos LL pelo LR.
3. Visita técnica aos laboratórios participantes.

Para execução desses processos, o profissional de laboratório deve ser habilitado e reunir as seguintes características:

1. Conhecimento atualizado das técnicas e princípios dos Programas de Controle da Tuberculose, das realidades regionais, das características da população e de práticas administrativas.
2. Experiência de campo.

3. Interesse no trabalho a ser feito.
4. Bom relacionamento interpessoal.
5. Flexibilidade e experiência para analisar problemas e sugerir práticas adequadas e medidas corretivas simples.
6. Sensibilidade para as necessidades de cada situação.
7. Experiência suficiente para antever problemas técnicos e solucionar eventuais imprevistos.

Uma das exigências previstas pelas normas de qualidade é a participação dos laboratórios em *programas de controle externo da qualidade*⁵, também entendidos como *programas de ensaios de proficiência*⁶.

Com objetivo de atender essas normas, a CGLAB está propondo, entre outros, um *Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Baciloscopia para Tuberculose* (AEQ – TB).

Entre os benefícios da participação dos laboratórios na (AEQ-TB), destacam-se:

- Avaliação externa e regular.
- Meios objetivos de demonstrar a confiabilidade dos dados que são produzidos.
- Comparação do seu desempenho com o de outros laboratórios semelhantes.
- Identificação dos problemas não detectáveis internamente.
- Subsídio à implantação de ações preventivas e corretivas para melhoria dos procedimentos do laboratório.
- Disponibilidade de informações sobre as características de desempenho de métodos analíticos.

Entre os objetivos do programa, destacamos os seguintes:

- Avaliar o desempenho dos laboratórios em análises específicas.
- Identificar problemas técnicos pontuais e diferenças interlaboratoriais.
- Complementar a supervisão *in loco* de laboratórios.
- Indicar ações preventivas e/ou corretivas, quando necessárias.

As principais características da AEQ-TB são:

- O caráter educativo.
- A participação voluntária, incentivada pela CGLAB.
- O sigilo em relação às recomendações de ações preventivas e ou corretivas e à identidade dos participantes.

As principais atribuições do coordenador do programa, designado pela CGLAB são:

- Coordenação do planejamento e implementação do programa.
- Participação na seleção dos profissionais do comitê assessor.
- Definição das responsabilidades dos membros do comitê assessor.
- Definição do acesso aos dados e resultados do programa.

2.4.1 Teste de Proficiência (TP)

Um dos componentes do *Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Baciloscopia para Tuberculose* da CGLAB é o teste de proficiência. O TP proporciona aos laboratórios participantes meios objetivos de demonstrar a confiabilidade de seus dados através da comparação de resultados com outros laboratórios semelhantes.

O Teste de Proficiência coordenado pela CGLAB consiste:

- No envio, pela CGLAB, de um painel contendo 10 lâminas com esfregaço de escarro, corados pelo Método de Ziehl-Neelsen para os laboratórios participantes.
- Na análise e encaminhamento dos resultados das lâminas pelo laboratório participante para a CGLAB.
- Na comparação e análise dos resultados do laboratório participante com os resultados previamente conhecidos.
- Na comunicação, pela CGLAB, ao laboratório participante do seu desempenho na análise das lâminas.

A participação dos laboratórios deverá ser formalizada e o processo formalização deverá ser constituído de:

- Ofício convite elaborado pela CGLAB dirigido aos responsáveis dos laboratórios alvo do programa, modelo de ofício é apresentado nos anexos deste capítulo.
- Formulário de participação do laboratório na AEQ, modelo de formulário é apresentado nos anexos deste capítulo.
- Ofício informativo do envio do painel com as características éticas e técnicas da AEQ, modelo de ofício é apresentado nos anexos deste capítulo.
- Formulário de Recebimento do Material e Identificação do Profissional Participante do AEQ, modelo de formulário é apresentado nos anexos deste capítulo.
- Formulário para Envio dos Resultados, modelo de formulário é apresentado nos anexos deste capítulo.

2.4.2 Releitura de lâminas

É uma atividade orientadora e educacional, exercida por profissionais, com reconhecida experiência, com o objetivo de melhorar a qualidade do trabalho e promover o desenvolvimento profissional.

Em 2007, a CGLAB, em conjunto com um grupo de técnicos representantes de LACEN sob a coordenação de uma consultoria internacional da OMS, elaborou o Protocolo de Controle Externo de Qualidade da Baciloscopia (PCEQB) segundo recomendações do Consenso Global¹. Ressaltamos que o foco desse controle de qualidade é a identificação de problemas dos laboratórios e não a identificação de erros individuais ou de correção de diagnóstico de pacientes.

O objetivo do PCEQB é definir procedimentos e estabelecer critérios para a execução da releitura de lâminas ou controle externo de qualidade da rede de laboratórios de baciloscopia. O PCEQB se aplica a todos os laboratórios que realizam baciloscopia para o diagnóstico e controle da Tuberculose no âmbito do Sistema Único de Saúde.

O controle externo de qualidade (CEQ) consiste no envio de lâminas já lidas nos LL para os LR ou LA para releitura e subsequente análise estatística, buscando determinar variações e discordâncias. A releitura é feita sem que o profissional avaliador conheça o resultado da baciloscopia fornecido pelo laboratório participante.

O PCEQB recomenda também a avaliação da qualidade do esfregaço, da coloração e da numeração das lâminas, procedimentos que influenciam na qualidade do resultado.

2.4.2.1 Fundamentos do CEQ da baciloscopia

O CEQ da baciloscopia consiste na avaliação do desempenho de laboratórios que realizam baciloscopia através da releitura, por parte de um LA, de uma amostra representativa, selecionada através de amostragem aleatória, das lâminas examinadas na rotina do LL e a qualificação do grau de concordância/discordância entre ambas leituras. O PCEQB utiliza o sistema de controle de qualidade por amostragem de lote, recomendado pelo Consenso Global¹ para determinar o tamanho da amostra para que ela seja representativa.

O sistema de controle de qualidade por amostragem de lote é um sistema baseado na prevalência estimada de lâminas positivas e na produção total trimestral de lâminas de um laboratório em particular.

2.4.2.2 Determinação da amostra

No PCEQB, o tamanho da amostra foi desenhado para uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 100%, em um nível de confiança de 95% descrito no Quadro 2, e adequado ao índice de positividade da baciloscopia dos laboratórios analisados, para obter-se uma amostragem de lâminas positivas e negativas.

O grupo determinou que o tamanho da amostra é de 80 lâminas por laboratório a ser avaliado, em função do número médio de exames realizados pelos LL e a capacidade do LA de realizar a releitura.

Fundamentos do tamanho da amostra

A sensibilidade é a capacidade de descobrir os resultados positivos no LL comparados com o LA. Em função da dificuldade de se obter uma sensibilidade de 100%, em razão dos resultados das lâminas com poucos bacilos (de 1 a 9 BAAR em 100 campos observados), recomenda-se utilizar um intervalo de sensibilidade entre 75 e 85%, neste protocolo fixamos o valor de 80% de sensibilidade, valor apresentado no Quadro 2.

A especificidade é a capacidade de detectar os resultados negativos. Por razões operacionais se adotou, neste protocolo, a especificidade de 100%.

Quadro 2 Tamanho da amostra recomendado para releitura de lâminas (anual ou trimestral)

LÂMINAS EXAMINADAS ANUALMENTE	POSITIVIDADE				18%
	5%	10%	13%	15%	
200	107	72	61	54	46
300	129	80	67	59	50
400	143	86	70	61	51
500	154	89	71	62	52
700	167	92	75	65	54
1000	180	96	76	66	55

WHO, APHI, CDC, IUATLD, KNCV e RIT. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy, Cooperative Agreement. U60/CCU303019, Washington DC. 2002.

Preparo da Amostra

- Definição do quociente proporcional:** O quociente proporcional é obtido através da divisão do número total de lâminas recebidas por 80 (tamanho da amostra). No caso do resultado ser um número decimal, arredondar para o número inteiro mais próximo, com a condição que sejam no mínimo 80 lâminas. Caso o sorteio não atinja as 80 lâminas, sortear aleatoriamente outras lâminas para completar o tamanho da amostra.
Exemplo: Se o laboratório analisou durante o trimestre um total de 1.420 lâminas, o quociente proporcional é obtido da divisão de 1.420 por 80 = 17,7 ou seja, 18.
- Escolha do número de partida:** Através de uma tabela de números aleatórios ou procedimento equivalente, deverá ser sorteado um número qualquer entre 1 e 18.
Exemplo: foi sorteado o número 15.
- Seleção das lâminas:** A primeira lâmina a ser selecionada corresponde ao número de partida. No exemplo, a décima quinta lâmina seqüencial a partir do primei-

ro número de ordem recebido. A partir dessa primeira lâmina é selecionada uma lâmina a cada 18, na ordem do livro de registro.

Exemplo: Se o LL encaminhou cópia do registro das lâminas com números de ordem que começam em 215 e acabam em 1.635, as lâminas selecionadas são 230 – 248 – 266 – 284, e assim sucessivamente até completar 80 lâminas.

ATENÇÃO: Se no período avaliado o laboratório não atingir o tamanho da amostra (80 lâminas) deverá ser realizada a releitura de todas as lâminas.

2.4.2.3 Fluxo de lâminas

O LA deverá solicitar a cada LL o envio de cópia das folhas do Registro de Baciloscopia, que contém o número de ordem e os resultados das lâminas examinadas durante o período a ser avaliado (trimestral ou semestral) através de um documento conforme descrito no item 2.9.3.1 dos anexos deste capítulo. Deve ser solicitado também, todas as lâminas relativas ao período a ser avaliado. Para o laboratório cuja produção de baciloscopia não atinja o total de lâmina necessário para a amostragem representativa no período de 3 meses, deverá ser solicitado as lâminas de um período maior – 4 a 6 meses.

O LL deverá encaminhar ao LA as lâminas e a cópia dos registros solicitados no prazo máximo de dez dias seqüenciais após a solicitação.

2.4.2.4 Responsabilidades no PCEQB

Laboratório Avaliador

- Coordenar e avaliar as atividades do PCEQB.
- Solicitar através de formulário padronizado, item 2.9.3.1 dos anexos deste capítulo, as baciloscopias que foram realizadas pelos LL de sua abrangência.
- Verificar se as lâminas enviadas para releitura correspondem aos números de registro descritos na relação.
- Preparar a amostra conforme descrito acima.
- Realizar uma revisão macroscópica dos esfregaços das lâminas e classificá-los conforme item 2.4.2.5 deste capítulo.
- Realizar a releitura microscópica dos esfregaços, conforme descrito no item 6.5.1 do Capítulo 6 deste manual.
- Registrar os resultados no formulário de Registro de Resultados, item 2.9.3.4 dos anexos deste capítulo.
- Avaliar o desempenho dos LL com base na comparação dos resultados obtidos, conforme descrito no item 2.4.2.5 deste capítulo.

- Elaborar relatório conforme descrito no item 2.9.3.6 dos anexos deste capítulo.
- Enviar o relatório aos responsáveis pelo LL e coordenadores dos PCT Municipal e Estadual.

Laboratório Local

- Conservar em condições adequadas as lâminas examinadas.
No item 2.9.3.2 dos anexos deste capítulo apresentamos as orientações de conservação das lâminas para o CEQ para os LL.
- Encaminhar ao LA, quando solicitado, as lâminas e cópia das páginas do Registro de Baciloscopia do mesmo período.
No item 2.8.3.2 dos anexos deste capítulo apresentamos as orientações de conservação das lâminas para o CEQ para os LL.

2.4.2.5 Avaliação das lâminas

Critérios para as releituras das lâminas

- O técnico avaliador não deverá conhecer os resultados das lâminas recebidas antes de realizar as releituras.
- A releitura das lâminas deverá ser realizada utilizando os critérios de leitura para diagnóstico, conforme descrito no item 6.5.1 do Capítulo 6 deste manual.

Frequência da avaliação dos LL

Elaborar um cronograma anual de avaliações dos laboratórios, conforme descrito nos anexos deste capítulo no item 2.9.3.3. Dependendo da possibilidade do LA serão realizadas uma ou duas avaliações anual de cada LL.

Avaliação das características técnicas das lâminas

Avaliação macroscópica do esfregaço

O profissional avaliador deverá analisar o esfregaço de cada uma das lâminas, classificando-os como:

- a) Satisfatório: Homogêneo
- b) Não satisfatório: Não homogêneo

Caso o esfregaço seja classificado como não homogêneo fazer uma segunda classificação:

Não homogêneo:

- Espesso
- Delgado

Avaliação Microscópica do Esfregaço

Na avaliação microscópica devem ser avaliados dois aspectos:

- I) Coloração
- II) Concordância de resultados

I) Coloração

O profissional avaliador deverá analisar a coloração de cada uma das lâminas, classificando-as como:

- a) Satisfatória
- b) Não satisfatória: Descoloração inadequada

Caso a coloração seja classificada como descoloração inadequada deve ser realizada uma segunda classificação:

- Presença de cristais de fucsina
- Excesso de aquecimento

O critério para qualificar as características técnicas relacionadas acima é baseado na avaliação das deficiências que eventualmente ocorram, podendo induzir a erros de interpretação e, portanto, a resultados falso-positivos ou falso-negativos.

Após classificar os esfregaços quanto a qualidade do esfregaço e da coloração de um laboratório realizar o cálculo do percentual de adequação do esfregaço.

Exemplo:

- **Número de esfregaços adequados dividido pelo total de esfregaços classificados X 100 = A**
- **Número de esfregaços com coloração adequada dividida pelo total de esfregaços classificados X 100 = B**

Para classificação final do esfregaço realizar o seguinte cálculo:

- Classificação final da qualidade do esfregaço = $A + B$ dividido por 2
 - i) Se o resultado encontrado for $> 80\%$ a qualidade do esfregaço é Adequada.
 - ii) Se o resultado encontrado for $< 80\%$ a qualidade do esfregaço é Inadequada.

Um resultado abaixo de 80% indica uma necessidade de capacitação em coleta de escarro e em confecção e coloração de esfregaço.

II) Avaliação das concordâncias/discordâncias dos resultados

As diferenças dos resultados no número de cruces em lâminas positivas, não são consideradas discordâncias significativas para o diagnóstico do paciente.

São classificadas como discordantes:

- a) **Falso Negativa (FN)**: lâminas com resultado negativo no LL e positivo na releitura.
- b) **Falso Positiva (FP)**: lâminas com resultado positivo no LL e negativo na releitura.

O cálculo da concordância é feito de acordo com a seguinte tabela:

Análise de Concordância

		LABORATÓRIO AVALIADOR		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Laboratório Local	Positivo			
	Negativo			
	Total			

Nº Lâminas FN _____
 Nº Lâminas FP _____

% Relativo de FN _____
 % Relativo de FP _____

Cálculo de Concordância, FP e FN

		LABORATÓRIO AVALIADOR		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Laboratório Local	Positivo	(a)	(b)	(a+b)
	Negativo	(c)	(d)	(c+d)
	Total	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

% concordância: $(a+d) / (a+b+c+d)$

Resultados FN: (c)

Resultados FP: (b)

% relativo de resultados FN: $[c / (c+d)] \times 100$ (Nº FN/ Total resultados negativos do Laboratório Local x 100)

% relativo de resultados FP: $[b / (a+b)] \times 100$ (Nº FP/ Total resultados positivos do Laboratório Local x 100)

Toda vez que uma releitura caracteriza uma discordância, deverá ser realizada uma segunda releitura confirmatória, por um outro técnico.

As lâminas com discordâncias confirmadas deverão ser revistas junto com o técnico do LL, para verificação da discordância, na visita técnica.

Diferenças de resultados em lâminas com 1 a 9 BAAR em 100 campos observados não são classificadas como discordâncias importantes. Nesses casos, porém, a diferença é anotada no formulário **Relatório do Controle de Qualidade da Baciloscopia**, no campo das observações.

ATENÇÃO: O índice de concordância (C) esperada é de 100% e é expresso de acordo com a seguinte fórmula:

$$C\% = \frac{\text{Nº lâminas concordantes}}{\text{total de lâminas relidas}} \times 100$$

Registro de resultados e ações corretivas

Registros

Os resultados das releituras devem ser registrados no formulário apresentado no item 2.9.3.4 **Formulário de Registro de Resultados** nos Anexos deste capítulo, e devem ser arquivados em pastas correspondentes ao LL e/ou arquivo informatizado.

Relatório do Resultado do Controle de Qualidade

O resultado do CEQ deve ser encaminhado ao LL no prazo máximo de 30 dias após o recebimento das lâminas. O resultado do CEQ deve ser encaminhado através ofício acompanhado do **Relatório do Controle de Qualidade da Baciloscopia**. Modelo de ofício e de relatório são apresentados nos itens 2.9.3.5 e 2.9.3.6 dos Anexos deste Capítulo.

Relatório da avaliação técnica

Quando as lâminas encaminhadas pelo LL forem classificadas como **inadequadas**, de acordo com os critérios estabelecidos anteriormente, o relatório de avaliação deve informar as principais deficiências técnicas observadas, orientar o laboratorista sobre as possíveis causas e recomendar as ações pertinentes para corrigi-las.

IMPORTANTE: Caso a amostragem não contemple lâminas positivas, selecionar algumas para avaliar a coloração. Essas lâminas não entrarão no cálculo da amostragem.

Relatório da análise de concordância

Conclusão: é a avaliação final dos resultados da releitura de lâminas.

Exemplo de conclusão

- Concordância total = 100%: Parabenizar o laboratório como forma de incentivo.
- Concordância total < 99%: Não aprovado.

Recomendações

Investigar as possíveis causas de erro como microscópio, corantes, técnicas de esfregaço, coloração e leitura, erros de numeração e transcrição dos resultados.

Considerações sobre as condutas a seguir em caso de discordância

Medidas corretivas devem ser tomadas em caso de concordância total < 99%. Essas medidas devem ser capacitação, visita técnica, substituição de reagentes ou uma segunda avaliação, devendo ser programadas em conjunto com o LL.

A detecção de um FP é considerada erro grave, exigindo uma investigação **imediata** das causas.

A detecção de um FN indica que o laboratório apresenta um erro significativo e, portanto, não estará aprovado no controle de qualidade.

É importante considerar todas as causas potenciais de erros, incluindo a qualidade dos corantes, a técnica de coloração e preparo de esfregaço, a qualidade e manutenção do microscópio, e procedimentos administrativos incorretos como registros e emissão de laudos.

Relatório geral

No item 2.9.3.7 dos anexos deste capítulo, apresentamos modelo de registro geral onde deverão ser compilados os resultados de todos os laboratórios avaliados durante o ano. Esse relatório deve ser encaminhado aos responsáveis pelos laboratórios e coordenadores municipais e estadual dos PCT.

2.4.3 Visita técnica aos laboratórios locais

A visita técnica é o processo mais adequado para observar as condições de um laboratório e as atividades técnicas nele desenvolvidas. Por ter um contato direto, é mais efetivo e permite propor ações corretivas de acordo com os recursos e possibilidades locais. É imprescindível que as visitas técnicas sejam realizadas de forma programada, sistemática, periódica, e que o LA disponha de apoio e de recursos financeiros da instituição a que está vinculado.

As vantagens da visita técnica sobre os outros componentes do CEQ são:

- Permitir contato direto com a equipe técnica do LL.
- Motivar a equipe técnica.
- Observar diretamente a prática laboratorial.
- Identificar causas de erro.
- Verificar a qualidade e funcionamento dos equipamentos.

As desvantagens são:

- Ser um processo seletivo, e difícil de extrapolar os dados para o resto da rede de laboratórios.
- Exigir muito tempo de trabalho.
- Ter um custo relativamente elevado.

É uma atividade que precisa ser realizada durante o período de trabalho, especialmente quando há mudanças de recursos humanos, de procedimentos, de local ou de equipamento. Permite a coleta de dados para o PCEQB e melhora o fluxo de informação entre os diversos níveis laboratoriais.

Recomenda-se como rotina uma visita anual e, se necessário, uma frequência maior.

A seguir, apresentamos o roteiro de verificações da visita técnica

Roteiro operacional

- Avaliar condições de infra-estruturas.
- Verificar se a norma de prazo para emissão dos resultados (especialmente os casos positivos) está sendo seguida.
- Verificar se as lâminas estão guardadas apropriadamente para o controle externo de qualidade.
- Verificar se a equipe técnica tenha sido capacitada para as técnicas específicas.
- Avaliar a carga de trabalho em relação a disponibilidade de profissionais.
- Verificar e avaliar a quantidade de baciloscopias realizadas e a proporção de lâminas positivas.
- Verificar se os casos positivos notificados pelo laboratório constam dos registros da unidade de tratamento.
- Verificar também os seguintes requisitos:
 - Possuir POP das técnicas e manuais de laboratório.
 - Possuir insumos em quantidade e qualidade adequadas.
 - Possuir um planejamento para compra de insumos necessários.
 - Possuir equipamentos (microscópio) em funcionamento apropriado.
 - Possuir um sistema de controle de qualidade interno.
 - Possuir normas de biossegurança.
 - Possuir controle de saúde dos profissionais periódicos.
 - Possuir registro de acidentes de trabalho.
 - Possuir e manter registros dos exames padronizados.
 - Possuir requisição de exame padronizada.

Roteiro técnico

- Observar e avaliar a classificação de qualidade da amostra, os processos de preparação de esfregaço, coloração e leitura.
- Assegurar que sejam feitos os controles de qualidade dos corantes.
- Fazer releitura de algumas lâminas com o profissional do local, para avaliar a qualidade do esfregaço, da coloração e da leitura.
- Revisar os resultados anteriores do controle externo de qualidade por releitura, discutir sugestões e recomendações para o melhoramento.

Roteiro de verificação de indicadores fundamentais

- Quantas amostras foram realizadas por sintomático respiratório.
- Qual a positividade da baciloscopia diagnóstica.
- Qual o percentual de sintomáticos respiratórios positivos a baciloscopia.
- Qual a positividade da baciloscopia total.
- Qual o percentual de amostras com aspecto de saliva.
- Qual o percentual de positividade da baciloscopia de amostras com aspecto de saliva.

No item 2.9.4 nos anexos deste capítulo apresentamos um protocolo para visita técnica.

2.5 Responsabilidade dos laboratórios em relação à Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

Para que a AEQ seja efetiva e produza bom nível de informação, os laboratórios devem ter a responsabilidade de cumprir os seguintes requisitos:

Laboratório Local

- Enviar as lâminas em boas condições ao LR.
- Fornecer todas as informações solicitadas dentro do tempo determinado.
- Utilizar os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde para realização dos exames.
- Discutir os resultados obtidos com toda a equipe.
- Corrigir falhas detectadas e seguir as orientações recebidas.

Laboratórios de Referência

- Elaborar e enviar o relatório padrão confidencial aos laboratórios participantes em um prazo de 30 dias.
- Estar disponível para discutir os resultados discrepantes e propor soluções.

2.6 Benefícios da AEQ para o Ministério da Saúde e para os laboratórios

Quadro 3 Benefícios da AEQ para o Ministério da Saúde e para os Laboratórios Participantes

MINISTÉRIO DA SAÚDE	LABORATÓRIOS PARTICIPANTES
Fornecer informações sobre os padrões de desempenho e das metodologias utilizadas em nível nacional	Revela áreas de dificuldade
Indica se os recursos financeiros estão sendo bem empregados	Melhora o padrão de desempenho da equipe
Ajuda a identificar áreas com problemas, planejar e orçar as atividades do PCT	Permite que os resultados sejam utilizados como uma ferramenta de gerência
Ajuda a manter e a aumentar os padrões nacionais de desempenho	É educativo
Contribui para estabelecer credibilidade internacional	Contribui para estabelecer credibilidade local

Fonte: Ministério da Saúde. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. 2001

2.7 Indicadores para avaliação de desempenho do laboratório

Indicador I

Percentual de resultados de baciloskopias liberados até 24 horas após a recepção da amostra no período da avaliação.

- **Interpretação**
Um percentual maior do que 15% de resultados liberados mais de 24 horas depois da recepção das amostras significa que o laboratório não está contribuindo, de maneira satisfatória, para busca rápida das fontes de infecção na comunidade.
- **Uso**
Avaliar a capacidade de resposta do laboratório em relação a realização da baciloscopia e liberação dos resultados em tempo ideal (máximo de 24 horas).
- **Período de Avaliação**
Trimestral
- **Método de cálculo**

$$\frac{\text{Nº de resultados liberados 24 horas após recepção no laboratório em determinado período} \times 100}{\text{Total de baciloskopias liberadas no mesmo período}}$$

- **Fonte de dados:**
Registro de baciloscopia.

Indicador II

Percentual de amostras de escarro para diagnóstico, com aspecto de saliva, no período de avaliação.

- Interpretação

Um percentual maior do que 15% pode indicar que não estão sendo dadas as orientações adequadas para a coleta de escarro ou que os pacientes só conseguem produzir amostras com aspecto de saliva.

- Uso

Avaliar a qualidade das amostras recebidas, para diagnóstico e a necessidade ou não de capacitação do profissional que orienta o paciente para coleta.

- Período de Avaliação

Trimestral

- Método de cálculo

$$\frac{\text{Nº de amostras de escarro recebidas com aspecto de saliva em determinado período} \times 100}{\text{Total de amostras de escarro recebidas no laboratório em mesmo período}}$$

- Fonte de dados:

Registro de baciloscopia.

Indicador III

Percentual de lâminas com os esfregaços preparados inadequadamente no período de avaliação

- Interpretação

Um percentual maior do que 10% de esfregaços inadequados indica a probabilidade de um aumento de resultados falso e uma conseqüente diminuição na detecção de fontes de infecção.

- Uso

Avaliar a necessidade de capacitação do profissional que prepara os esfregaços.

- Período de Avaliação

Determinado pela AEQ

- Método de cálculo

$$\frac{\text{Nº de esfregaços considerados inadequados pela AEQ em determinado período} \times 100}{\text{Total de esfregaços submetidos AEQ no mesmo período}}$$

- Fonte de dados:

Relatório da AEQ emitido pelo LR

Indicador IV

Percentual de lâminas que apresentam esfregaços com coloração inadequada no período de avaliação.

- Interpretação
Um percentual acima de 10% de esfregaços com coloração inadequada alerta para um possível aumento dos resultados falsos positivos ou negativos.
- Uso
Avaliar a necessidade de capacitação do profissional que realiza a coloração dos esfregaços e controle de qualidade dos reagentes.
- Período de avaliação:
Determinado pela AEQ
- Método de cálculo

$$\frac{\text{Nº de lâminas com esfregaços inadequados submetidos a AEQ. em determinado período} \times 100}{\text{Total de lâminas submetidas a AEQ no mesmo período}}$$

- Fonte de dados:
Relatório da AEQ emitido pelo LR

Indicador V

Positividade da baciloscopia de diagnóstico de tuberculose, entre escarros de SR adultos, no período em avaliação.

- Uso:
Avaliar o rendimento da baciloscopia no diagnóstico da TB, a capacidade do técnico para leitura de lâminas e qualidade da amostra.
- Período de avaliação:
Trimestral para municípios e semestral para estados.
- Método de Cálculo:

$$\frac{\text{Nº de lâminas para diagnóstico positivas em determinado período} \times 100}{\text{Nº de lâminas para diagnóstico realizadas no mesmo período}}$$

- Fonte de dados:
Registro de baciloscopia
- Parâmetro de avaliação e interpretação
É esperado um percentual entre 5 e 10%, um percentual maior pode indicar que a busca de SR não está adequada. Um percentual menor indica que a amostra não é adequada.

- Exemplo:
400 = número de baciloscopia para diagnóstico com resultado positivo em um período de 1 ano.
1.600 = número total de baciloscopia para diagnóstico no período de 1 ano.

$$\frac{400 \times 100}{1.600} = 25\% \text{ das baciloscopias são positivas}$$

- Possíveis causas
Estágio tardio da doença.
Orientação inadequada ao paciente para coleta de escarro e/ou amostras coletadas por indução.
- Possíveis correções
Capacitar o profissional responsável pela busca de SR para fazer diagnóstico precoce da doença.

Indicador VI

Número de baciloscopias realizadas por sintomático respiratório (SR) no período de avaliação.

- Uso:
Avaliar o número de baciloscopias realizadas por SR e indiretamente avaliar o aporte de segunda amostra no diagnóstico de TB.
- Período de avaliação:
Trimestral para municípios e semestral para estados.
- Método de cálculo:

$$\frac{\text{Nº total de baciloscopias para diagnóstico realizadas no período}}{\text{Nº de baciloscopias primeira amostra realizadas no período}}$$

- Fonte de dados:
Registro de baciloscopia
- Parâmetro de avaliação e interpretação:
A norma técnica recomenda pelo menos duas baciloscopias por SR, um número menor pode indicar que a busca de SR está inadequada, a orientação ao paciente é inadequada e isso pode diminuir a possibilidade de fazer o diagnóstico oportuno da doença.
- Exemplo:
3.000 = nº de baciloscopia para diagnóstico realizadas no período de 1 ano.

2.000= nº de SR investigado pelo laboratório (primeira amostra) para diagnóstico no período de 1 ano.

$$\frac{3.000}{2.000} = 1,5 \text{ baciloscopia por SR}$$

- Possíveis causas:
Recursos humanos não capacitados ou o não cumprimento pelo profissional de saúde da norma.
Orientação inadequada ao paciente para coleta de escarro.
- Possíveis correções:
Capacitar o profissional responsável pela busca de SR para fazer diagnóstico precoce da doença e sensibilizar o profissional da importância da segunda amostra.

2.8 Referências

1. AZIZ *et al.* *External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy*, Cooperative Agreement. U60/CCU303019, Washington DC. 2002.
2. SEQUEIRA, M.D. *Garantía de Calidad de Baciloscopías – Evaluación Externa de Laboratorios de Referencia Nacional*. Argentina. Draft – Versão de agosto de 2006.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. *Manual TELELAB. 2001. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia*. Brasília. 2001.
4. WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part III Culture*. Geneva. Switzerland. WHO/TB/98.258. 1998.
5. NORMA NIT-DICLA-083:2001. Critérios gerais para competência de laboratórios clínicos.
6. NBR ISO/IEC 17025:2001 *Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*.
7. WHO/World Health Organization. *Laboratory Services in Tuberculosis Control*. Part 1: Organization and Management. WHO, Geneva, 1998.
8. ABNT ISO/IEC GUIA 43-1:1999 *Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais*.
9. NORMA NIT-DICLA-026:2003 Requisitos sobre a participação dos laboratórios de ensaios em atividade de ensaio de proficiência.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Critérios para Habilitação de Provedores de Ensaio de Proficiência Segundo os Princípios da ISO GUIA 43 Procedimento GGLAS 02/43, 2001.

2.9 Anexos do capítulo

2.9.1 Formulários do CQI dos Reagentes

2.9.1.1 Formulário – Controle de qualidade interno da água utilizada no laboratório.



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle de Qualidade Interno da Água Utilizada no Laboratório

	Procedência	Nº do Lote	Validade
Água da Torneira			
Água destilada estéril			
Data da Coleta			
Água da torneira			
Água destilada			
Responsável:			Data de Emissão:

Água Destilada			
Esterilização Autoclave - Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado
			☐ Reprovado
Responsável:			Data de Emissão:

Controle Micobacteriológico da Água da Torneira	
Exame Direto do Sedimento/Coloração pelo Método de Ziehl-Neelsen:	
☐ Aprovado. Ausência de BAAR	☐ Reprovado. Presença de BAAR
Semeadura em LJ	Incubação a 36 ± 1°C por 8 semanas
☐ Aprovado. Não houve crescimento	☐ Reprovado. Houve crescimento de BAAR
Responsável:	
Data de Emissão:	

2.9.1.2 Formulário – Controle de preparação da Fucsina fenicada a 0,3%.



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Fucsina Fenicada a 0,3%

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Álcool etílico 95% PA			
Fucsina básica			
Cristal de fenol			
Água Destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Álcool etílico 95% PA	
Fucsina básica	
Cristal de Fenol	
Água Destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	Data de Execução:

Controle do Desempenho da Fucsina Fenicada a 0,3%	
CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de vermelho e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, como o esperado. ☐ Lote do corante está validado	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. ☐ Lote do corante invalidado
Responsável:	Data de Execução:

2.9.1.3 Formulário – Controle de preparação da Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle de Preparação da Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Álcool etílico comercial			
Ácido Clorídrico concentrado			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Álcool etílico comercial	
Ácido Clorídrico concentrado	

Responsável:	Data de Execução:

2.9.1.4 Formulário – Controle de preparação de Azul de Metileno 0,3%



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle de Preparação de Azul de Metileno 0,3%

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Azul de Metileno			
Água destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Azul de Metileno	
Água destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	Data de Execução:

Controle do Desempenho do Azul de Metileno a 0,3%	
CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de vermelho, com fundo azul e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, mas apresentou fundo azul, como o esperado ☐ Lote do corante está validado	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. ☐ Lote do corante invalidado
Responsável:	Data de Execução:

2.9.1.5 Formulário – Controle de preparação de Auramina fenicada



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle de
Preparação de Auramina Fenicada

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Álcool etílico 95% PA			
Auramina O			
Fenol líquido			
Água Destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Álcool etílico 95% PA	
Auramina O	
Fenol Líquido	
Água Destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	Data de Execução:

Controle do Desempenho da Auramina Fenicada	
CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de amarelo e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, como o esperado. ☐ Lote do corante está validado	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. ☐ Lote do corante invalidado
Responsável:	Data de Execução:

2.9.1.6 Formulário - Controle da preparação da Solução Descolorante de Álcool-ácido a 1% para o método da fluorescência



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Controle da preparação da Solução Descolorante de Álcool-ácido a 1% para o método da fluorescência

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Álcool etílico comercial			
Ácido Clorídrico concentrado			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Álcool etílico comercial	
Ácido Clorídrico concentrado	

Responsável:	Data de Execução:

2.9.1.7 Formulário – Controle de preparação da Solução de Permanganato de Potássio



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle de Preparação da Solução de Permanganato de Potássio

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Permanganato de Potássio			
Água destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Permanganato de potássio	
Água destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	Data de Execução:

Controle do Desempenho do Permanganato de Potássio	
CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de amarelo, com fundo preto e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, mas apresentou fundo preto, como o esperado. ☐ Lote do corante está validado	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. ☐ Lote do corante invalidado
Responsável:	Data de Execução:

2.9.1.8 Formulário – Controle de preparação da Solução de Tinta Nanquim Azul



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle de Preparação da Solução de Tinta Nanquim Azul

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Tinta nanquim azul			
Água destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Tinta nanquim azul	
Água destilada	

Pesagem Balança - Marca:

Responsável:	Data de Execução:
--------------	-------------------

Controle do Desempenho da Tinta Nanquim Azul	
CQI positivo apresentou presença de BAAR corados de amarelo, com fundo azul e o CQI negativo não apresentou presença de BAAR, mas apresentou fundo azul, como o esperado. ☐ Lote do corante está validado	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado. ☐ Lote do corante invalidado
Responsável:	Data de Execução:

2.9.2 Formulários da AEQ

2.9.2.1 Modelo de ofício convite aos laboratórios



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
Esplanada dos Ministérios, Edifício Sede, 1º andar
CEP. 70.058-900 - Brasília-DF

Ofício Circular nº CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Brasília, data.

A Sua Senhoria o(a) Senhor(a)
Diretor(a) do Laboratório

Assunto: **Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Baciloscopia para Tuberculose.**

Senhor(a) Diretor(a)

1. Com o objetivo de promover, coordenar, apoiar e fomentar ações dos serviços prestados pela rede de laboratórios de saúde pública visando à saúde da população atendida, a Coordenação Geral de Laboratórios – CGLAB tem como uma de suas estratégias incentivar os laboratórios na implantação de um sistema de garantia da qualidade.
2. Uma das exigências previstas pelas normas de qualidade é a participação dos laboratórios em “**programas de controle externo da qualidade**” (NIT-DICLA-083/NBR ISO/IEC 17025:2001).
3. Neste caso a CGLAB entende que é fundamental a implantação de um Programa de Avaliação Externa da Qualidade – AEQ das análises laboratoriais realizadas pelas redes por ela coordenada.
4. Diante do exposto, a Secretaria de Vigilância em Saúde, representada pela CGLAB, convida esse laboratório para participar do **Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Baciloscopia para Tuberculose**.
5. O laboratório deverá confirmar sua participação, por meio do Formulário de Participação, anexo, que deverá ser enviado a CGLAB, por correio e e-mail para o coordenador do programa até **15 dias** após o recebimento do mesmo.
6. Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Coordenador Geral
CGLAB/DEVEP/SVS

Diretor
DEVEP/SVS/MS

2.9.2.2 Formulário de participação



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Participação

Primeiro Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Baciloscopia para Tuberculose	
Instituição:	UF:
Nome do Diretor/ Coordenador:	
E-mail para contato:	Telefone:
☐ O laboratório concorda em participar do Primeiro Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Baciloscopia para Tuberculose organizado pela CGLAB.	
☐ O laboratório não gostaria de participar da avaliação externa nesse momento pelo motivo abaixo assinalado:	
☐ não se considera suficientemente capacitado no presente momento	☐ não tem interesse
☐ outro motivo	Qual ?:
Identificação do Laboratório Participante	
Nome do contato no laboratório para o envio do painel:	
Endereço do local de entrega do painel (com código postal):	
Telefone:	E-mail:
Assinatura do responsável pela instituição	Data:
Solicitamos que este formulário seja enviado à CGLAB, pelo correio, até 15 dias após o recebimento do mesmo, mesmo que o laboratório não concorde em participar da avaliação.	

2.9.2.3 Modelo de ofício de envio do painel aos laboratórios



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
COORDENAÇÃO GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA

Ofício Circular nº CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Brasília, data.

A Sua Senhoria o(a) Senhor(a)
Responsável pelo Laboratório de Tuberculose

Assunto: **Programa de Avaliação Externa da Qualidade da Baciloscopia para Tuberculose**

Prezado(a) Senhor(a):

1. A Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, diante da aceitação desse laboratório em participar do **Programa de Avaliação Externa da Qualidade da Baciloscopia para Tuberculose**, está enviando um painel contendo 10 lâminas com esfregaços de escarro corados por Ziehl-Neelsen.
2. O laboratório deverá, após a análise, enviar o painel de lâminas, o Formulário de Recebimento do Material e Identificação do Profissional Participante do AEQ e o Formulário para Envio dos Resultados (anexos) preenchidos para a CGLAB por correio.
3. Os painéis deverão ser devolvidos seguindo os procedimentos para conservação e limpeza das lâminas descritas no capítulo 2 do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Esclarecemos que faz parte do processo de avaliação do laboratório as condições de devolução dos painéis.
4. A metodologia de leitura do painel deverá ser realizada de acordo com a descrita no capítulo 6 do manual citado. O profissional indicado para a análise do painel deverá realizar a leitura de 15 lâminas por dia levando no mínimo 5 e no máximo 10 minutos por lâmina. As lâminas deverão ser lidas sem recorrer à ajuda de terceiros.
5. A CGLAB enviará para o laboratório participante o relatório dos resultados da AEQ lembrando que neste relatório a identificação dos laboratórios será mantida em sigilo.
9. Outras informações e esclarecimentos poderão ser feitos por meio de telefone ou e-mail.

Atenciosamente,

Coordenador Geral
CGLAB/DEVEP/SVS

Diretor
DEVEP/SVS/MS

2.9.2.4 Formulário de recebimento do material e identificação do profissional participante do AEQ



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Recebimento do Material e Identificação do Profissional Participante do AEQ

1. Identificação do Laboratório		
Nome:		
Endereço:		UF:
Município:	CEP:	Telefone:
Regional de Saúde: ☐ Sim ☐ Não		Qual?:
E-mail para contato:		
2. Informação sobre o Material Recebido		
2.1 - Data de recebimento do painel:	2.2 - A embalagem de transporte chegou: ☐ fechada ☐ aberta	
2.3 - Acondicionamento das lâminas: ☐ condições adequadas ☐ condições inadequadas		
Descrever:		
2.4 - Responsável pelas informações dos itens 2.1, 2.2 e 2.3:		
Nome:	Assinatura:	
3. Informações do Participante Responsável pela Leitura das Lâminas e pelas Informações do Equipamento Utilizado:		
Nome:		
Grau de Escolaridade: ☐ Ensino Fundamental ☐ Ensino Médio ☐ Formação Universitária		
Dedicação exclusiva ao laboratório de tuberculose?		
☐ Sim	☐ Não	Se a resposta for sim, quantas lâminas lê por mês:
Participou de treinamento para coleta de amostra clínica, preparação e leitura da baciloscopia, aplicado por órgão oficial: ☐ Sim ☐ Não		Se a resposta for SIM, quando:
Qual órgão responsável pelo treinamento:		Há quanto tempo realiza leitura de baciloscopia: _____(anos)
4. Informações do Equipamento Utilizado:		
Fabricante/Modelo:		
Tempo de uso do microscópio: ☐ mais que 5 anos ☐ menos que 5 anos.		Possui objetiva de 100x planacromática: ☐ Sim ☐ Não
É realizada manutenção no microscópio: ☐ Semestral ☐ Anual ☐ Só quando estraga		
O microscópio é de uso exclusivo do laboratório de tuberculose: ☐ Sim ☐ Não		

2.9.2.5 Formulário para envio dos resultados à CGLAB



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário para Envio dos Resultados à CGLAB

[illegible]

2.9.3 Formulários do programa de controle externo da qualidade da baciloscopia

2.9.3.1 Modelo de ofício de solicitação de lâminas

Logotipo do Laboratório Avaliador									
Of. nº...../.....	Data:								
Ilmo Sr. Chefe do Laboratório (Local)									
Em cumprimento ao Programa de Controle Externo de Qualidade da Baciloscopia da Tuberculose, solicitamos o envio do material listado abaixo, para realização da releitura das Baciloscopias. - Todas as lâminas do período _____ ; - Uma cópia das páginas do Registro de Baciloscopia, com o registro dos exames do período correspondente. Atenção: As lâminas devem ser enviadas em ordem numérica, sem separar as positivas das negativas.									
Enviar para o endereço:									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td colspan="2" style="height: 20px;">Laboratório (Avaliador)</td></tr><tr><td colspan="2" style="height: 20px;">Rua</td></tr><tr><td style="width: 50%; height: 20px;">CEP:</td><td style="width: 50%; height: 20px;">Cidade</td></tr><tr><td style="height: 20px;">Fone:</td><td style="height: 20px;">Fax:</td></tr></table>		Laboratório (Avaliador)		Rua		CEP:	Cidade	Fone:	Fax:
Laboratório (Avaliador)									
Rua									
CEP:	Cidade								
Fone:	Fax:								
Atenciosamente,									
Responsável pelo Laboratório Avaliador									

2.9.3.2 Orientações para conservação das lâminas



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Orientações para Conservação das Lâminas

Os Laboratórios Locais devem:

- Após a leitura, retirar levemente o excesso de óleo de imersão com papel absorvente macio, sem prejudicar o esfregaço.
- Conservar a numeração original.
- Guardar em ordem numérica todas as lâminas examinadas, independentemente do resultado, por um período mínimo de seis meses.
- Guardar as lâminas em caixa específica para conservação. Caso não disponha, recomenda-se envolver cada lâmina separadamente em papel suave sem nenhuma anotação e, após esse procedimento fazer pacotes com 50 lâminas, no máximo, em papel de embrulho comum.
- Armazenar as caixas ou pacotes em local fresco e ao abrigo da luz.

2.9.3.3 Formulário – Cronograma da Releitura das Lâminas



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Cronograma da Releitura das Lâminas

Laboratório:												Ano:			
Laboratórios a serem avaliados	MESES														
	JAN.	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.			

2.9.3.4 Formulário de registro de resultados do CEQ



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Registro de Resultado do CEQ

[illegible]

- (1) Resultado da releitura no LA.
- (2) Satisfatório, não satisfatório (não homogêneo, espesso e delgado).
- (3) Satisfatória, não satisfatória (descoloração inadequada, cristais de fucsina, aquecimento excessivo).
- (4) Resultado: Negativa ou Positiva (em cruzes) do Laboratório Local.

2.9.3.5 Modelo de ofício de encaminhamento de relatório de resultados



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
COORDENAÇÃO GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA

Ofício Circular nº CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Brasília, data.

Ao Sr.
Responsável Técnico do Laboratório:

Estamos enviando, anexo, o **Relatório de Resultados do Controle Externo da Qualidade da Baciloscopia da Tuberculose**, referente ao período de ____/____/____ a ____/____/____.

Solicitamos dar conhecimento deste resultado ao(s) profissionais que realizam baciloscopia em sua Instituição.

Ficamos à sua inteira disposição para quaisquer informações complementares.

Atenciosamente,

Responsável

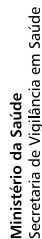
2.9.3.6 Formulário para relatório do controle externo da qualidade da baciloscopia



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Relatório do Controle Externo da Qualidade da Baciloscopia

Laboratório Local:			Período: de (Mês) a (Mês) de (Ano)		
Avaliação Técnica					
Análise Macroscópica e Microscópica					
Esfregaço			Coloração		
	Nº	%		Nº	%
Satisfatório			Satisfatória		
Não homogêneo			Descoloração Inadequada		
Espero			Cristas de fucsina		
Delgado			Aquecimento excessivo		
TOTAL		100	TOTAL		100
☐ Adequada ($\geq 80\%$)			☐ Inadequada ($< 80\%$)		
Análise de Concordância					
			Laboratório Avaliador		
			Positivo	Negativo	Total
Laboratório Local	Positivo				
	Negativo				
	Total				
Nº Lâminas FN: _____			% Relativo de FN: _____		
Nº Lâminas FP: _____			% Relativo de FP: _____		
Nível de Concordância:					
C = % (___/___ Lâminas) onde (a+d / a+b+c+d lâminas)					
Conclusão:					
Recomendações:					
Data			Assinatura		

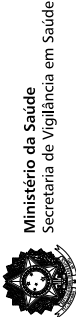


Programa de Controle Externo de Qualidade da Baciloscopia

- FP – quantidade de lâminas classificadas como falso-positivo;
- FN – quantidade de lâminas classificadas como falso-negativo;
- A – adequado;
- I – inadequado;
- C – discordância em cruzes.

Indicar se foi feita alguma supervisão direta, ou se foi realizado treinamento (curso ou estágio) no período.

2.9.4 Formulário – Protocolo para visita técnica



Sistema de Garantia da
Qualidade de Baciloscopia

Roteiro para Visita Técnica - Laboratório de Tuberculose	
Orientações: Esse instrumento deve ser preenchido pelo avaliador acompanhado pelos profissionais do LAB responsáveis pela Qualidade e Biossegurança e pelo Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose. Esse instrumento deverá ser assinado no final pelo avaliador e pelos profissionais do LAB que acompanharam o processo.	
SIGLAS: A – Atende, AR – Atende com restrições (o requisito é atendido parcialmente, ou nos documentos apresentados faltam informações ou não estão totalmente corretos), EL – Em elaboração (é necessário evidenciar minutas), N – Não atende, NAP – Não se aplica	
I - DADOS DO LABORATÓRIO	
Laboratório:	Data
Município:	
Rua/Av.	
Bairro:	CEP
Fone:	FAX
e-mail:	
Chefe do Laboratório de Tuberculose:	
Funcionários:	

II - INFRA-ESTRUTURA									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
	A	AR	N	A	AR	EL	N	NAP	
1. Possuir dimensões e construção adequadas para realização da baciloscopia: (a) recepção de amostras; (b) registro de dados, liberação de resultados; (c) microscopia (d) realização de esfregaço e coloração (e) área para autoclave	A - Possui ambientes suficientes e com construção adequada para a realização da baciloscopia AR - Possui espaços (b) e (c) juntos N - Os ambientes não são suficientes e/ou inadequados para a realização da baciloscopia								
Outras situações encontradas:									

III - RECURSOS HUMANOS									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
	A	AR	N	A	AR	EL	N	NAP	
2. Possuir número suficiente de pessoal para realização da baciloscopia	A - Há profissionais para preparação de todos os procedimentos da baciloscopia: recepção, registro, confecção do esfregaço e leitura (máximo 20 baciloscopias em 4 horas de trabalho/dia). N - O número de profissionais é insuficiente para atender a demanda do laboratório								
Outras situações encontradas:									

IV - TREINAMENTO									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
	A	AR	N	A	AR	EL	N	NAP	
3. Possuir pessoal treinado para a realização da baciloscopia	A - Os técnicos que realizam baciloscopia receberam treinamento pelo Laboratório Referência ou no próprio laboratório nos últimos 2 anos N - Os técnicos que realizam baciloscopia nunca foram treinados								
Outras situações encontradas:									

V - ORGANIZAÇÃO INTERNA E DOCUMENTAÇÃO									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
4. Possuir instruções documentadas e disponíveis para a coleta, acondicionamento, conservação e transporte de amostras.	A - Possui instruções documentadas e disponíveis de instruções para a coleta de amostras AR - Possui instruções documentadas, mas necessitam ser mais bem divulgadas ou faltam informações EL - Instruções em elaboração N - Não existem instruções	A	AR	EL	N	NAP			
Outras situações encontradas:									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
5. Possuir procedimento documentado e aprovado (POP) com critérios para aceitação e rejeição de amostras clínicas.	A - Existem POP inclusive com critérios para aceitação e rejeição de amostras clínicas AR - Existem POP mas incompletos EL - Os POP estão em elaboração N - Não existem POP	A	AR	EL	N	NAP			
Outras situações encontradas:									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
6. Possuir mecanismos de cadastramento unívoco das amostras clínicas que garantam sua identificação e rastreabilidade durante toda a sua permanência no laboratório. (Registro de Baciloscopia ou similar)	A - Possui mecanismos de cadastramento unívoco de amostras que garantam sua identificação e rastreabilidade durante toda a sua permanência no laboratório N - Não possui mecanismos de cadastramento unívoco de amostras que garantem sua identificação e rastreabilidade durante toda a sua permanência no laboratório.	A	AR	EL	N	NAP			
Outras situações encontradas:									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada					
7. Possuir e utilizar o sistema SILTB ou outro sistema informatizado.	A - Possui e utiliza o SILTB ou outro sistema informatizado N - Não utiliza	A	AR	EL	N	NAP			
Outras situações encontradas:									

Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada
8. Informar mensalmente a Vigilância Epidemiológica (informe mensal de resultados de baciloscopia)	A - Informa mensalmente AR - Informa esporadicamente N - Não informa	A AR EL N NAP
Outras situações encontradas:		
Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada
9. Utilizar e estar disponível no laboratório os manuais recomendados em nível nacional	A - Sim, utiliza e estão disponíveis N - Não	A AR EL N NAP
Outras situações encontradas:		
Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada
10. Possuir documento (POP) das técnicas de baciloscopia	A - Existem POP das técnicas com todas as informações AR - Existem POP das técnicas, mas são incompletos EL - Os POP estão em elaboração N - Não existem POP	A AR EL N NAP
Outras situações encontradas:		
Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada
11. Apresentar laudo de forma legível e com informações suficientes para a identificação do laboratório, do solicitante, do paciente, da amostra, datas (coleta, entrada no laboratório, da realização dos ensaios e da emissão do laudo) e dos métodos utilizados e assinados pelos responsáveis por sua emissão.	A - Possui laudos com as informações necessárias e de forma legível AR - Possui laudo de forma legível e com informações incompletas EL - O modelo de laudo está em elaboração N - Os laudos não possuem as informações necessárias	A AR EL N NAP
Outras situações encontradas:		

VI - ASPECTOS TÉCNICOS									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
1.2. Realizar numeração e divisão da lâmina para confecção do esfregaço	A - Numeração e linha divisória adequada				A	AR	EL	N	NAP
	AR - Linha divisória inadequada								
	N - Numeração com caneta de retroprojeto/ lápis dermatográfico ou ilegível								
Outras situações encontradas:									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
1.3 Realizar confecção do esfregaço de escarro obedecendo as normas do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias ou Manual TELELAB - Baciloscopia	A - Realiza o esfregaço de acordo com as recomendações				A	AR	EL	N	NAP
	AR - Não realiza a pré-lavagem das lâminas com detergente								
	N - Não utiliza aplicadores de madeira								
Outras situações encontradas:									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
1.4 Realizar a coloração do esfregaço segundo as normas do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias ou Manual TELELAB - Baciloscopia	A - Realiza a coloração de acordo com as recomendações				A	AR	EL	N	NAP
	AR - Não utiliza as concentrações dos corantes recomendados e/ou os tempos recomendados e/ou não filtra os corantes								
	N - Não utiliza o método de Ziehl-Neelsen								
Outras situações encontradas:									

VII - EQUIPAMENTOS									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
15. Possuir os equipamentos abaixo para a realização da baciloscopia: microscópio, balança, geladeira, autoclave		A -	Possui todos os equipamentos para a correta realização da baciloscopia	A	AR	EL	N	NAP	
		AR -	Possui os equipamentos em condições inadequadas e/ou microscópio em quantidade insuficiente						
		N -	Não possui os equipamentos necessários						
Outras situações encontradas:									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
16. Possuir procedimento documentado ou POP aprovado para operação, verificação e limpeza dos equipamentos, mantendo os registros correspondentes.		A -	Atende o requisito	A	AR	EL	N	NAP	
		EL -	Atende o requisito, mas faltam informações, ou não tem para todos os equipamentos Procedimento em elaboração						
		N -	Não existe procedimento nem registro						
Outras situações encontradas:									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
17. Possuir programa de manutenção preventiva para os equipamentos, que atenda as recomendações dos fabricantes, e manter registros das manutenções corretivas e preventivas realizadas.		A -	O programa existe e está aprovado e implantado e são mantidos os registros das manutenções	A	AR	EL	N	NAP	
		AR -	O programa existe, mas não são mantidos os registros das manutenções						
		EL -	O programa está em elaboração						
		N -	O programa não existe						
Outras situações encontradas:									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
18. Possuir os insumos armazenados corretamente		A -	Atende o requisito	A	AR	EL	N	NAP	
		N -	Não atende o requisito						
Outras situações encontradas:									

Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada				
	A - Atende o requisito N - Não atende o requisito	A	AR	EL	N	NAP
19. Possuir reagentes/soluções preparados no laboratório e os adquiridos com rótulo de identificação de origem, grau de pureza e validade.						
Outras situações encontradas:						

Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada				
	A - Atende o requisito N - Não atende o requisito	A	AR	EL	N	NAP
20. Possuir procedimento para a identificação de trabalhos não conformes incluindo as ações corretivas.						
Outras situações encontradas:						

Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada				
	A - Possui registros do controle interno N - Não possui registros do controle	A	AR	EL	N	NAP
21. Possuir um sistema de controle de qualidade interno devidamente registrado						
Outras situações encontradas:						

Requisito	O que verificar e as possíveis situações	Condição encontrada				
	A - Possui registros do controle externo N - Não possui registros do controle	A	AR	EL	N	NAP
22. Participar de programas de controles externo da qualidade, mantendo os registros dos resultados						
Outras situações encontradas:						

VIII - BIOSSEGURANÇA									
Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
		A - Sim N - Não			A	AR	EL	N	NAP
23. Possuir as normas de biossegurança relacionados com a baciloscopia, limpeza e desinfecção de superfícies e tratamento de resíduos									
Outras situações encontradas:									

Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
		A - Sim N - Não			A	AR	EL	N	NAP
24. Possuir Equipamentos de Proteção Individual (EPI) adequados e em número suficiente para baciloscopia									
Outras situações encontradas:									

Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
		A - Sim N - Não			A	AR	EL	N	NAP
25. Possuir controle médico periódico da equipe de profissionais									
Outras situações encontradas:									

Requisito		O que verificar e as possíveis situações			Condição encontrada				
		A - Sim N - Não			A	AR	EL	N	NAP
26. Possuir documentos de instruções em caso de acidente com material clínico e os registros correspondentes									
Outras situações encontradas:									

IX - INDICADORES									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações				Condição encontrada				
27. Possuir registros periódicos do indicador: Número total de baciloskopias realizadas num período determinado. Percentual de baciloskopias para diagnóstico.	A - Possui registros				A	AR	EL	N	NAP
	N - Não realiza o cálculo do indicador								
Outras situações encontradas:									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações				Condição encontrada				
28. Possuir registros periódicos do indicador: Percentual de positividade da baciloscopia para diagnóstico.	A - Possui registros				A	AR	EL	N	NAP
	N - Não realiza o cálculo do indicador								
Outras situações encontradas:									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações				Condição encontrada				
29. Possuir registros periódicos do indicador: Percentual de baciloskopias liberadas no prazo de 24 horas.	A - Possui registros				A	AR	EL	N	NAP
	N - Não realiza o cálculo do indicador								
Outras situações encontradas:									
Requisito	O que verificar e as possíveis situações				Condição encontrada				
30. Possuir registros periódicos do indicador: Percentual de amostras para diagnóstico com aspecto de saliva. Percentual de resultados positivos em amostras: saliva.	A - Possui registros				A	AR	EL	N	NAP
	N - Não realiza o cálculo do indicador								
Outras situações encontradas:									

RELATÓRIO FINAL DA VISITA TÉCNICA	
Laboratório:	DATA:
Facilidades:	
Limitações:	
Recomendações:	
Assinaturas:	
Nome e assinatura do avaliador	
Nome e assinatura do profissional do laboratório que acompanhou a avaliação dos requisitos de qualidade	
Nome e assinatura do profissional que acompanhou a avaliação dos requisitos específicos do laboratório de tuberculose	
Local:	Data:

BIOSSEGURANÇA

3.1 Descrição

Biossegurança é a condição de segurança alcançada quando da utilização conjunta de equipamentos de proteção, práticas e procedimentos laboratoriais, e estrutura física da instituição, destinados a minimizar a exposição dos funcionários e do meio ambiente aos agentes infecciosos.

Pela Classificação dos Agentes Etiológicos Baseado no Grau de Risco¹ a espécie *Mycobacterium tuberculosis* integra o grupo de risco III, juntamente com outros microrganismos capazes de infectar através de aerossóis^{2,3}.

Profissionais de laboratórios apresentam risco de infecção pelo *M. tuberculosis* de 3 a 5 vezes maior do que o risco de outras pessoas^{4,5}. A exposição dos profissionais de laboratório aos aerossóis infecciosos depende do número de amostras clínicas e culturas positivas para *M. tuberculosis* processadas diariamente por um único profissional e da adesão rígida às normas de biossegurança. Para isso, torna-se necessário que os laboratórios de saúde pública disponham ou implantem um programa de Biossegurança amplo com medidas administrativas e técnicas. As medidas de biossegurança em laboratórios de bacteriologia da tuberculose variam de acordo com a complexidade dos exames realizados, podendo ser nível de biossegurança II (para procedimentos que não geram aerossóis) e/ou nível de biossegurança III^{2,6}.

Entre as medidas administrativas, pode se destacar o monitoramento dos técnicos escolhidos para trabalhar no laboratório de bacteriologia da tuberculose, através da realização do teste tuberculínico (PPD) e o RX de tórax, e seu treinamento nas técnicas de segurança e nos procedimentos usualmente empregados no diagnóstico da tuberculose, além do fornecimento de equipamentos de proteção adequados para a realização do trabalho⁴. Cabe aos profissionais dos laboratórios a responsabilidade pelo uso correto desses equipamentos de proteção e o correto seguimento das medidas administrativas adotadas pela instituição.

A grande maioria das infecções que ocorre nos laboratórios de bacteriologia da tuberculose é atribuída à produção de aerossóis potencialmente infecciosos; portanto, o objetivo dessas medidas é reduzir a exposição desses profissionais, da comunidade e do meio ambiente aos agentes potencialmente perigosos.

O termo contenção é usado para descrever os métodos de segurança utilizados na manipulação de materiais infecciosos em um meio laboratorial onde estão sendo manejados ou mantidos. O objetivo da contenção é reduzir ou eliminar a exposição da equipe de um laboratório, de outras pessoas e o meio ambiente em geral aos agentes potencialmente perigosos. Os três elementos de contenção incluem a prática e a técnica laboratorial, o equipamento de segurança e o projeto da instalação⁷.

Para reduzir a geração de aerossóis pelos procedimentos laboratoriais e sua dispersão, é preciso a utilização de um conjunto de medidas técnicas descritas a seguir.

3.2 Barreiras de contenção primárias

Constitui a primeira linha de proteção quando se trabalha com agentes infecciosos. As boas práticas microbiológicas, cabines de segurança biológica, centrífugas com capota de segurança, luvas, máscaras e aventais são exemplos de barreiras primárias utilizadas nos laboratórios de bacteriologia da tuberculose, as referências^{7,8}.

3.2.1 Boas práticas microbiológicas^{9, 10}

Compreendem as práticas e técnicas microbiológicas padronizadas, que devem ser seguidas para todos os procedimentos realizados no laboratório, valendo a pena salientar que a adesão rígida a elas é o principal componente de contenção⁴.

A seguir são descritas algumas das Boas Práticas Microbiológicas que devem ser adotadas nos laboratório.

- Restringir ou limitar o acesso ao laboratório apenas para os profissionais autorizados.
- Não comer, beber, fumar ou aplicar maquiagem no laboratório.
- Não pipetar com a boca, fazer uso de dispositivos de pipetagem.
- Fazer higienização das mãos com água e sabão apropriado ao entrar no laboratório, após manipulação de amostras, após a realização de qualquer procedimento bacteriológico, após tirar as luvas e o jaleco e antes de sair do laboratório.
- Manipular material potencialmente infeccioso apenas em áreas restritas, afastadas da circulação geral.
- Usar luvas durante a execução de suas atividades. Não manusear maçanetas, telefones, puxadores de armários ou outros objetos de uso comum enquanto estiver de luvas.
- Realizar cuidadosamente todos os procedimentos a fim de evitar a formação de aerossóis.

3.2.2 Equipamentos de Proteção Individual (EPI)

São equipamentos de proteção utilizados individualmente pelos profissionais como ferramenta de trabalho, destinados à proteção do trabalhador, minimizando riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho. Os EPI não evitam os acidentes em si, mas protegem o profissional quando o risco está ligado à função do mesmo e sua exposição ao agente. Deve-se considerar que o risco está associado ao tipo e quantidade de agente infeccioso, tempo de exposição e sensibilidade do organismo de cada profissional. Existem vários tipos de EPI, cada qual com sua finalidade e modo de usar, com especificações muito particulares dependendo da atividade a ser executada, sendo os mais utilizados as luvas, máscara, avental e calçados fechados.

O uso de luvas, máscaras, aventais e calçados fechados deve sempre fazer parte de toda as etapas do diagnóstico laboratorial da tuberculose, desde a recepção das amostras até a execução de técnicas mais complexas.

As luvas devem ser de material resistente, ter baixa permeabilidade e boa flexibilidade e ser descartáveis. Nunca reutilize as luvas, descarte-as de forma segura.

As máscaras utilizadas pelos profissionais de laboratório devem ser aprovadas pelo CDC através do National Institute for Ocupacional Safety and Health (NIOSH). No Brasil, os EPI devem ter registro junto ao Ministério do Trabalho. Para a proteção contra a tuberculose são utilizadas as do tipo N95, que apresentam porosidade de eficiência igual ou maior do que 95%, para reter partículas de 0,3 μ . Elas devem adaptar-se perfeitamente ao formato do rosto do usuário e podem ser reutilizadas pelo mesmo profissional por períodos longos, desde que se mantenham íntegras (não amassadas, dobradas e rasgadas), secas e limpas. A manutenção das máscaras em sacos plásticos não é recomendada por reter umidade. Para protegê-las e permitir o uso mais prolongado, deve-se envolvê-las em papel-toalha e manter em local seguro¹¹.

Os aventais devem ser de mangas longas, com punhos sanfonados, de fechamento frontal, com botões, preferencialmente de pressão, mantidos permanentemente fechados, de comprimento abaixo dos joelhos, em tecido de algodão ou de fibra sintética não inflamável^{9,10}. O uso do avental deve ser restrito à área de trabalho, e devem ser guardados em locais apropriados, nunca em armários junto com objetos de uso pessoal. O avental deve ser descontaminado por autoclavagem ou por descontaminação química antes de ser lavado^{8,9}.

3.2.3 Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC)

São os dispositivos ou equipamentos utilizados para prevenção de acidentes e proteção de profissionais em áreas de trabalhos e arredores dos setores e unidades executoras de atividades de risco.

A cabine de segurança biológica (CSB) é um dos principais dispositivos de contenção primária utilizados para possibilitar a contenção de derrames infecciosos ou aerossóis gerados por muitos procedimentos microbiológicos realizados em laboratórios que manipulam *M. tuberculosis*⁸.

Existem três tipos de cabine de segurança biológica utilizadas em laboratórios de microbiologia. As cabines de segurança biológica de classe I, II e III, sendo algumas classes subdivididas em tipos A, B1 e B2 dependendo do uso a que se destinam.

As cabines de classe II são câmaras abertas que oferecem níveis significativos de proteção ao pessoal de laboratório e ao meio ambiente quando utilizadas em conjunto com boas práticas microbiológicas. Esse tipo de cabine também protege contra a contaminação externa de materiais (e.g. culturas de células, culturas microbianas de estoque) que são manipulados dentro dela. As CSB de classe II quando mantidas

adequadamente e utilizadas em conjunto com as boas práticas microbiológicas proporcionam um nível de contenção apropriado para os laboratórios de bacteriologia da tuberculose^{2,3,4}.

Todos os procedimentos geradores de aerossóis nos laboratórios de bacteriologia da tuberculose² devem ser realizados no interior dessas cabines. Os principais procedimentos geradores de aerossóis são: agitação de amostras em alta velocidade, maceração de biópsias, agitação e pipetagem de culturas líquidas do bacilo da tuberculose.

Apesar de se saber que o *M. tuberculosis* pertence ao grupo de risco III, alguns procedimentos para o diagnóstico da tuberculose podem ser realizados em laboratórios de nível de biossegurança II, podendo citar, como exemplo, a baciloscopia direta e processamento de amostras biológicas por métodos que não exijam agitação. Esses procedimentos podem ser realizados fora da CSB, na bancada com o auxílio de chama de um bico de Bunsen¹².

As CSB devem ser testadas e certificadas no laboratório onde vão ser utilizadas, ao serem instaladas, sempre que forem removidas, e preventivamente, uma ou duas vezes ao ano, dependendo do uso¹². Como para qualquer outro equipamento, os profissionais devem ser treinados para utilização adequada das cabines de segurança biológica, em particular, para evitar atitudes que rompam o fluxo de ar dentro desses equipamentos, comprometendo sua eficiência.

Não utilize a CSB para manipulação de substâncias voláteis, para isso utilize as capelas de exaustão química.

As capelas de exaustão química são equipamentos que protegem os profissionais na manipulação de substâncias que liberam vapores tóxicos ou irritantes. Esse equipamento é necessário na preparação de corantes e soluções químicas, jamais realizar estas atividades fora dela¹².

O fenol é irritante para os olhos e cancerígeno. Se o laboratório não dispuser de capela de exaustão, a solução de fenol a 5% e os corantes deverão ser preparados e distribuídos pelo laboratório de referência.

As centrífugas para trabalho em laboratórios de bacteriologia da tuberculose devem funcionar em velocidade suficiente para sedimentar os bacilos, isto é, em 3000 x g. Preferencialmente, devem ser refrigeradas evitando o aquecimento acima de 37°C. O rotor deve ser sem vibrações, angular e com tampa. É imprescindível que as caçapas sejam seladas, evitando a dispersão de aerossol caso haja a quebra de algum tubo durante a centrifugação. Para outras informações consulte o Capítulo 11 deste Manual.

Rotores com tampa ou caçapas de proteção são utilizados para evitar que aerossóis sejam liberados durante a centrifugação.

3.3 Barreiras de contenção secundária

O desenho das instalações laboratoriais pode constituir uma importante barreira de proteção pessoal, em geral, contra os agentes infecciosos que podem ser acidentalmente liberados do laboratório. A adoção de barreiras secundárias depende do risco de transmissão dos agentes infecciosos, devendo as instalações serem adequadas à função do laboratório e ao nível de segurança recomendado para os agentes infecciosos manipulados nesses locais. As barreiras secundárias recomendadas nestes laboratórios devem incluir a separação da área de trabalho laboratorial do acesso público, existência de uma área para descontaminação e locais para lavagem de mãos. À medida que o risco de transmissão dos microrganismos por aerossóis aumenta, tornam-se necessários níveis mais elevados de contenção primária e múltiplas barreiras secundárias para impedir a saída de agentes infecciosos para o meio ambiente. As características do desenho das instalações podem então incluir: sistemas de ventilação especializados que assegurem fluxo de ar direcionado, sistemas de tratamento do ar laboratorial para descontaminar ou remover agentes do ar liberado (ar expelido), áreas de acesso controlado, e possivelmente, o isolamento do laboratório em edifícios ou módulos separados⁸.

3.3.1 Instalações laboratoriais¹²

Ao construir ou reformar um laboratório é necessário consultar profissionais especializados que tenham conhecimento na área de biossegurança. As instalações do laboratório que realiza diagnóstico da tuberculose devem atender aos seguintes requisitos.

3.3.1.1 Requisitos gerais

Exigidos para qualquer laboratório de diagnóstico, ou seja, paredes, pisos e bancadas de superfície lisa, laváveis contendo apenas os equipamentos e materiais necessários aos procedimentos, para facilitar a limpeza e a descontaminação além de evitar acidentes.

3.3.1.2 Requisitos específicos

Para o diagnóstico laboratorial da tuberculose esses requisitos variam de acordo com o exame realizado, ou seja, baciloscopia e/ou cultura.

As instalações do laboratório que realiza a baciloscopia devem atender, no mínimo, aos seguintes requisitos de biossegurança.

- Na área onde os pacientes são atendidos para entregar amostras, recomenda-se também a instalação de um exaustor, com capacidade de 6 a 10 renovações do volume de ar por hora, para facilitar a retirada do ar contaminado. Outra reco-

mendação é que seja organizado um fluxo de atendimento dos pacientes que permita que eles permaneçam o menor tempo possível de espera.

- A área de recepção de amostras deve ser o mais próximo possível da sala de procedimentos, isolada das áreas comuns, e conter uma abertura *pass-through* que permita apenas a passagem das amostras acompanhadas da solicitação de exames.
- A área de realização dos procedimentos deve ser de forma a permitir um sistema de circulação de ar das áreas limpas para as áreas sujas.
- No caso de haver janelas estas devem estar localizadas de forma a não permitir correntes de ar na área de preparação de esfregaços, evitando assim a contaminação dos profissionais. Nessas áreas não deve haver ventiladores de teto.
- As janelas e portas dos laboratórios são úteis para ventilar o ambiente quando não há sistema de extração do ar e devem permanecer fechadas durante a realização dos procedimentos, podendo ser abertas no final de cada rotina de trabalho.
- As bancadas devem ser instaladas em ambiente apropriado para a preparação do esfregaço de maneira a ter boa iluminação.
- Recomenda-se também a instalação de um exaustor, com capacidade de 6 a 10 renovações do volume de ar por hora, para facilitar a retirada do ar contaminado.
- O ideal é que essa sala seja exclusiva para o preparo dos esfregaços. No entanto, se isso não for possível, é absolutamente necessário que seja definida uma área específica para esse fim, onde devem circular apenas os profissionais envolvidos com a bacilosopia.
- É fundamental também preparar os esfregaços no horário de menor movimento na sala. Jamais faça a manipulação das amostras ao mesmo tempo em que outras atividades estiverem sendo realizadas na mesma sala.
- Uma outra opção é ter uma sala de procedimentos equipada com CSB. Sempre que possível, deve-se utilizar a CSB para preparação dos esfregaços e todas as atividades que envolvam a manipulação do microrganismo.
- A descontaminação do material reutilizável e do lixo a ser descartado deve ser por autoclavação. Quando não houver autoclave no local, o lixo infeccioso deve ser recolhido juntamente com o lixo hospitalar.
- As atividades administrativas devem ser realizadas em áreas destinadas exclusivamente a elas, não sendo permitida nessas áreas a manipulação de amostras biológicas.
- As áreas para o preparo e armazenamento de corantes, desinfetantes e outras soluções devem ser equipadas com capela de exaustão química.
- Sala separada ou área restrita para a realização de cultura e/ou teste de sensibilidade com cabine de segurança biológica Classe II Tipo B2 ou B3, estufa bacteriológica e centrífuga

3.4 Transporte de amostras biológicas

Amostras clínicas precisam ser transportadas com segurança e dentro do tempo determinado, do local onde foram coletadas até o local onde vão ser analisadas para garantir a qualidade dos resultados.

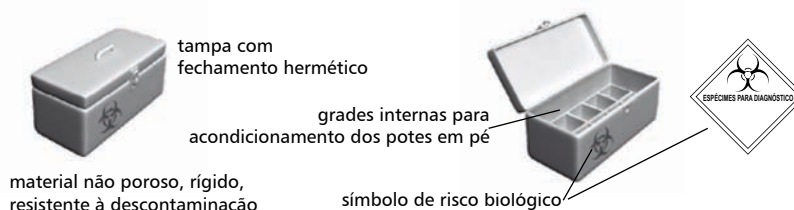
Os espécimes de origem humana devem ser acondicionados e transportados de maneira a proteger o pessoal responsável pelo transporte, dos riscos de infecção. A regulamentação do transporte de amostras e agentes biológicos é definida para assegurar a proteção ao público a aqueles que fazem o transporte, contra qualquer agente infeccioso que possa estar presente na embalagem⁴.

3.4.1 Transporte intra e interlaboratorial de amostras clínicas

As amostras clínicas devem ser transportadas, intralaboratorialmente, em caixas próprias com tampa, identificadas com o símbolo de risco biológico. Devem ser de material não poroso, rígido, resistente à descontaminação. Na Figura 1 são descritos o símbolo de risco biológico e a caixa para transporte de amostras.

Ao transportar amostras potencialmente patogênicas deve-se escolher o caminho menor e com menos obstáculos. O profissional responsável pelo transporte das amostras deve estar usando avental e luvas.

Figura 1 Símbolo de risco biológico e caixa para transporte de amostras



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

Quando a coleta de material clínico estiver localizada em outro serviço de saúde, deve-se acondicionar os frascos contendo as amostras biológicas em caixa apropriada, verificando se os mesmos encontram-se com as tampas bem fechadas e voltadas para cima. É recomendável colocar cada um dos frascos dentro de um saco plástico, pois, em caso de extravasamento, o risco biológico fica limitado ao saco plástico e não se espalha por toda a caixa.

Se o tempo de transporte for superior a 24 horas, coloque gelo reciclável. Se o serviço não tiver gelo reciclável, acondicione cubos de gelo comum dentro de um saco plástico resistente e bem vedado. A quantidade de gelo utilizada deve corresponder a, no mínimo, 1/3 do volume (cubagem) da caixa térmica; que deve ser hermeticamente fechada.

Coloque as solicitações de exames dentro de um saco plástico e prenda-o firmemente com fita adesiva, sobre a tampa, do lado externo da caixa. Jamais, coloque as solicitações dentro da caixa junto com as amostras.

Coloque sobre a tampa ou na lateral da caixa uma etiqueta com o nome e endereço do laboratório destinatário, nome da unidade de saúde remetente, endereço, telefone e fax. Notificar o laboratório receptor, hora e data do envio do material, para que esse programe a recepção das amostras.

3.4.2 Transporte intra e interlaboratorial de lâminas com esfregaço

O transporte dos esfregaços fixados de uma área do laboratório para outra, deve ser feito em caixas plásticas porta-lâminas bem fechadas.

As lâminas com esfregaço enviadas para a realização do controle de qualidade deverão ser acondicionadas em caixas plásticas porta-lâminas bem fechadas e identificadas com os nomes e endereços dos laboratórios destinatário e remetente.

ATENÇÃO: mesmo após a fixação ainda podem existir bacilos viáveis no esfregaço. Siga as normas de biossegurança para o transporte e identifique a caixa com o símbolo de risco biológico^{14, 15}, conforme descrito na Figura 1. Preferencialmente, não transportar lâminas sem corar ou amostra clínicas sem tratar previamente com Solução de Fenol a 5%.

3.4.3 Transporte interlaboratorial de cepas de micobactérias

O transporte de culturas positivas, por via aérea, deve seguir as normas internacionais da Associação Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association – IATA – <http://www.iata.org>).

Culturas de micobactérias devem ser transportadas em meio sólido em tubo de rosca ou em meio líquido. Se forem transportadas em meio líquido, devem ser em criotubos com miçangas, com tampa de rosca, anel de vedação e, a soma dos volumes dos criotubos, não pode ultrapassar 50 ml. Culturas em placas de Petri não devem ser transportadas.

As culturas devem ser embaladas em três recipientes. O frasco contendo a cultura bacteriana deve ser à prova de vazamento (recipiente primário), bem vedado, e deve ser colocado em um segundo recipiente também à prova de vazamento. Entre os dois recipientes deve haver quantidade suficiente de material absorvente. Por último, deve haver uma embalagem externa adquirida comercialmente. Essa última embalagem é destinada a proteger as outras embalagens e o material a ser transportado contra fatores externos, tais como impacto físico e contato com a água durante o transporte, como mostra a Figura 2.

A embalagem deve conter um rótulo que identifique o conteúdo como substância infecciosa (risco biológico)^{14, 15}.

Figura 2. Embalagens apropriadas para envio de amostras ou culturas patogênicas por via aérea



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

3.5 Procedimentos em casos de acidentes

Todo laboratório deve ter os procedimentos definidos e escritos que devem ser realizados no caso de acidentes. Os profissionais devem ser treinados para a realização desses procedimentos de forma correta.

3.5.1 Derramamento de material biológico no laboratório^{8, 10, 16}

Quando houver acidentes onde haja derrame de material biológico deve-se adotar os seguintes procedimentos.

- Solicitar as pessoas que estiverem na sala para sair imediatamente.
- Cobrir imediatamente o material biológico derramado com material absorvente para limitar a área afetada e minimizar a produção de aerossóis.
- Utilizar qualquer material disponível como, por exemplo, toalhas de papel.
- Derramar, sobre o material biológico já coberto, Solução de Fenol a 5%, deixar em repouso e sair imediatamente da sala.

ATENÇÃO: No item 3.8.1.1 dos anexos deste capítulo descrevemos a preparação da solução de Solução de Fenol a 5%.

- Esperar pelo menos 20 minutos para que o desinfetante possa agir.
- Recolher com um papel-toalha os materiais envolvidos no acidente (inclusive o material usado na limpeza); colocar tudo dentro de uma lata com tampa ou caixa de papelão resistente com tampa ou de um saco de lixo autoclavável.

- Encaminhar para autoclavagem e depois para descarte final.
- Descontaminar o local do acidente com gaze ou algodão embebido em Solução de Álcool a 70%.

Atenção: No item 3.8.1.2 dos anexos deste capítulo descrevemos a preparação da Solução de Álcool a 70%.

- Se houver quebra de tubos, o procedimento deve ser o mesmo descrito acima, observando as precauções para recolher o material quebrado, após a ação do desinfetante.

3.5.2 Derramamento dentro da cabine de segurança biológica^{10, 16}

Quando houver quebra de tubos contendo cultura líquida, respingo de amostras clínicas ou respingos de cultura líquida dentro da CSB deve-se adotar os seguintes procedimentos.

- Manter a CSB ligada, para conter os aerossóis que possam ser formados.
- Iniciar a limpeza o mais rápido possível utilizando o desinfetante apropriado (recomenda-se utilizar Solução de Fenol a 5%).
- Caso o derramamento ocorra em um recipiente, o mesmo deve ser descartado como material infeccioso.
- Se o derramamento ocorrer na superfície de trabalho, cobrir o material derramado com papel-toalha, e derramar sobre o material biológico já coberto, Solução de Fenol a 5%, deixar em repouso por no mínimo 20 minutos para remover o papel-toalha e descartá-lo como material infeccioso.
- Os materiais que estiverem dentro da CSB no momento do derramamento só deverão ser retirados após 20 minutos do acidente, tendo sido desinfetados com Solução de Fenol a 5%, antes de retirar da CSB. Dependendo do material deverá ser autoclavado em seguida.
- Os EPI utilizados para a realização da limpeza deverão ser autoclavados.
- Após a limpeza, a CSB deverá ficar ligada por mais 10 minutos com a lâmpada de ultravioleta ligada.

3.5.3 Derramamento de material biológico por quebra de tubos no interior da centrífuga^{10, 15}

No caso de quebra de tubos contendo suspensões de *M. tuberculosis* deve-se adotar os seguintes procedimentos.

- Interromper a operação, desligando a centrífuga.
- Manter a centrífuga fechada por pelo menos 30 minutos para que baixem os aerossóis.

- Remover as capas fechadas da centrífuga e levar para a CSB.
- Remover e descartar os fragmentos do tubo em condições seguras.
- Descontaminar a centrífuga, o rotor e as capas com desinfetante adequado (de acordo com as instruções do fabricante contidas no manual da centrífuga).
- Utilizar capa de segurança e tubos de polipropileno com tampa rosqueável.

3.6 Uso adequado dos equipamentos de laboratório

Os técnicos dos laboratórios de bacteriologia da tuberculose devem ser treinados no uso correto dos equipamentos para evitar acidentes e liberação de aerossóis infecciosos.

3.6.1 Uso de pipetas e de dispositivos auxiliares de pipetagem

- Usar sempre um dispositivo auxiliar de pipetagem (pipetador automático ou manual).
- Usar somente pipetas contendo barreira de algodão na extremidade superior interna, com a finalidade de reduzir o risco de contaminação dos dispositivos de pipetagem.
- Eliminar os líquidos das pipetas de forma suave.
- Cobrir a superfície da mesa de trabalho com um papel absorvente embebido em desinfetante, com o objetivo de evitar a dispersão de material infeccioso, se este cair acidentalmente da pipeta. Nesse caso, o papel deve ser autoclavado após o uso.
- Descartar as pipetas contaminadas, ainda dentro da CSB, mergulhando as pipetas por completo, horizontalmente, em recipiente inquebrável contendo água. Esterilizar o recipiente com as pipetas em autoclave.

ATENÇÃO: Autoclavar recipientes com solução de cloro poderá gerar gás cloro que é tóxico. Os compostos liberados de cloro provocam irritação da pele, dos olhos e do aparelho respiratório. Quando ingeridos, produzem irritação das membranas mucosas.

- Utilizar Solução de Álcool a 70 % para desinfecção de superfícies. Os casos de acidentes estão descritos no item 3.5 deste capítulo.

3.6.2 Uso de cabines de segurança biológica^{10, 16 17}

Proceder da seguinte forma ao utilizar a CSB.

- Fechar as portas do laboratório e evitar a circulação de pessoas na frente da CSB durante sua utilização. O local adequado para instalar uma CSB está descrito no Capítulo 11 deste manual.
- Ligar a CSB e a luz UV 10 a 15 minutos antes de seu uso¹⁸.

ATENÇÃO: Lâmpada ultravioleta (UV) germicida é uma lâmpada fluorescente, sem a deposição de pó de vidro como cobertura interna, que é responsável por transformar a radiação ultravioleta gerada pela lâmpada em luz visível. Sem a cobertura, a lâmpada emite apenas a radiação ultravioleta capaz de matar microrganismos a ela expostos. Esta emite raios no comprimento de onda de 253,7nm, que é o comprimento com efeito bactericida. Os microrganismos atingidos pela radiação UV sofrem modificação no DNA ou RNA, pela formação de dímeros de pirimidina, que formados entre moléculas adjacentes, podem interromper a replicação ou a transcrição levando à morte da bactéria.

- Desligar a luz UV e descontaminar a superfície interior com gaze estéril embebida em Solução de Álcool a 70%.
- Colocar dentro da CSB o mínimo indispensável de aparelhos e materiais. Esses materiais devem ficar atrás da área em que se desenvolve o trabalho e nunca sobre as grades de circulação de ar da CSB.
- Organizar os materiais de modo que os itens limpos e contaminados não se misturem.
- Não efetuar movimentos rápidos ou gestos bruscos na área de trabalho.
- Não permitir o uso da chama do bico de Bunsen, pois isto acarreta danos ao filtro HEPA e o aquecimento do ar pode gerar turbulência interrompendo o fluxo laminar.
- Limpar a CSB, ao término do trabalho, com gaze estéril embebida em Solução de Álcool a 70%.
- Deixar a CSB e a lâmpada UV ligadas por 10 a 15 minutos, antes de desligá-la.
- A maioria das CSB, além dos filtros HEPA e um sistema de direcionamento de ar, possuem uma lâmpada ultravioleta (UV) germicida. A eficiência do uso da UV como um meio de descontaminação ainda é motivo de controvérsia já que a UV além de não penetrar em partículas, está limitada à distância entre a luz e o material exposto a ela, e ao tempo de exposição. A exposição à UV é carcinogênica causando ceratoconjuntivite quando inadequadamente utilizada¹⁸.

ATENÇÃO: Antes da verificação das CSB ou trocas dos seus filtros HEPA deve-se realizar descontaminação das mesmas. Esse procedimento deve ser realizado por pessoal treinado através do uso de paraformaldeído, levando-se em conta o tamanho da área de trabalho da CSB, segundo recomendações do fabricante ou equipe que realiza a certificação; seguindo a norma NSF 49¹⁹ de 1983.

3.7 Referências

- 1 CDC/Centers for Disease Control, Office of Biosafety. Classification of Ethnologic Agents on the Basis of Hazard. 4. ed. [S.l]: US Department of Health, Education and Welfare; Public Health Service, Washington, DC, 1974.
- 2 ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Los servicios de laboratorio en el control de la tuberculosis*. Suíça, 1998.
- 3 CDC/Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5. ed, U.S. Department of Health and Human Services. Washington, DC, 2007.
- 4 BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia*. 3ª edição revista e atualizada, Serie a Normas e Manuais Técnicos, 2004.
- 5 KENT, P.T. & KUBICA, G.P. Public Health Mycobacteriology. *A Guide For The Level III Laboratory*, US Department of Health and Human Services; Public Health Service, Centersfor Disease Control, 1985.
- 6 CDC/Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services. *Goals for working safely with Mycobacterium tuberculosis in clinical, public health and research laboratories*.Atlanta, 1997.
- 7 BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. *Manual TELELAB. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia*, 72 p. Brasília. 2001.
- 8 FLEMING, D.O.; RICHARDSON, J.H.; TULIS, J.J.; VESLEY, D. *Laboratory Safety – Principles and Practices*, ASM Press 2nd ed. Washington, DC, 1995.
- 9 HIRATA, H.H.; FILHO, J.M. *Manual de Biossegurança*. Rio de Janeiro: Manole, 2002.
- 10 ODA, L. & ÁVILA, S.M. (org). *Biossegurança em Laboratórios de Saúde Pública*. Rio de Janeiro, 2 ed., 2000.
- 11 GONÇALVES, M.L.C. *Transmissão nosocomial da tuberculose: diminuindo o risco*. Boletim de Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, p. 21-25, v. 9 nº 2 jul/dez 2001.
- 12 OPAS/Organización Panamericana de la Salud. *Cabinas de Seguridad Biológica:Uso, Desinfección y Mantenimiento*. Washington, 2004.
- 13 WHO/World Health Organization. Guidance on regulations for the transport of infectious substances, 2007-2008. Applicable as from 1 January 2007.WHO/CDS/EPR/2007.2. Geneva, Switzerland, 2007.
- 14 BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. *Resolução RDC 302, de 13 de outubro de 2005*. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. DOU, Brasília, 2005.
- 15 SES-PR/Secretaria do Estado da Saúde do Paraná. Laboratório Central do Estado do Paraná. *Manual de Biossegurança e Segurança Química em Laboratório de Saúde Pública*. Curitiba, 2000.

- 16 KUEHNE, R.W.; et al., *Primary Barriers and Personal Protective Equipment in Biomedical Laboratories*, in: *Laboratory Safety – Principles and Practices*, p 145. 2nd Edition. Eds Diane O. Fleming, John H. Richardson, Jerry J. Tulis and Donald Vesley, 1995.
17. CDC/Centers for Disease Control and Prevention. Primary Containment for Biohazard: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets. 2nd Ed.; U.S. Department of Health and Human Services. Washington, DC, 2000.
18. UEKI S. Y. M.; GEREMIAS A. L.; MONIZ L. L.; LATRILHA F.O.; BRITO A.C.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; SIMEÃO F.C.S.; TELLES M.A.S. Cabine de segurança biológica: efeito da luz ultravioleta nas micobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 65(3):222-224, 2006.
19. NSF/National Sanitation Foundation. Appendix E: Standard 49 for Class II (laminar flow) biohazard cabinetry. In *Recommended Microbiological Decontamination Procedure*. Ann Arbor, MI: 4-E:39; 5-B:50, 1983.
- 20 BRASIL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS –ABNT. Norma Brasileira Registrada - NBR5992/80 - Determinação da massa específica e do teor alcoólico do Álcool Etílico e suas mistura com água, pág 31, Tabela 3: Teor alcoólico. 1980.

3.8 Anexos do capítulo

3.8.1 Preparação de reagentes

3.8.1.1 Quadro 1 – Preparação da Solução de Fenol a 5%

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE FENOL A 5%	
Cristal de fenol	50 g
Água destilada qsp	1.000 ml
1. Colocar o fenol em um balão de 1.000 ml.	
2. Adicionar 700 ml da Água destilada aos poucos no balão sobre o fenol.	
3. Colocar o balão para aquecer em banho maria até o fenol dissolver completamente.	
4. Retirar do banho maria e acrescentar Água destilada até completar 1.000 ml.	
5. Deixar esfriar em temperatura ambiente.	
6. Colocar a Solução de Fenol a 5% em um frasco âmbar de 1.000 ml, hermeticamente fechado para impedir desprendimento de vapores enquanto não está em uso, rotulado com as seguintes informações: nome da solução, data da preparação, de validade e a expressão "PRODUTO UTILIZADO APENAS PARA CONTENÇÃO DE DERRAMAMENTOS DE GRANDE VOLUME".	
7. Armazenar essa solução em temperatura ambiente.	

3.8.1.2 Quadro 2 – Preparação da Solução de Álcool a 70%

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ÁLCOOL A 70%	
Álcool etílico comercial 95%	700 ml
Água destilada qsp	1.000 ml
1. Colocar o álcool etílico em um balão de 1.000 ml.	
2. Adicionar Água destilada aos poucos no balão sobre o álcool etílico até completar 1000 ml.	
3. Colocar a solução de álcool etílico em um frasco bem vedado já rotulado com as seguintes informações: nome do corante, data da preparação e de validade.	
4. Armazenar ao abrigo da luz e a temperatura ambiente.	

OBS: O título “Solução de Álcool a 70%” significa percentagem em Peso/Peso (P/P), expressão usual. Na preparação da solução é mais prático trabalhar com volume ao invés de peso, portanto, faz-se necessário uma conversão para a correção do teor alcoólico. Para isto considerar a relação: 770ml(volume) correspondem a 700g (peso) do álcool etílico comercial 95%.²⁰

3.8.2 Formulários de controle da preparação

3.8.2.1 Formulário – Controle da Preparação da Solução de Fenol a 5%



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução de Fenol a 5%

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido
Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Cristal de fenol			
Água Destilada			
Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Cristal de Fenol			
Água Destilada			
Pesagem Balança - Marca:			
Responsável:			Data de Execução:

3.8.2.2 Formulário – Controle da Preparação da Solução de Álcool a 70%



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução de Fenol a 5%

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido
Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Cristal de fenol			
Água Destilada			
Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Cristal de Fenol			
Água Destilada			
Pesagem Balança - Marca:			
Responsável:			Data de Execução:

MICOBACTÉRIAS

4.1 Descrição

Após a comprovação de que os agentes etiológicos da tuberculose (TB) e da hanseníase tinham características morfológicas de bacilos e tintoriais de álcool-ácido resistência, Lehmann e Neumann, em 1896, agruparam os agentes como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, estabelecendo as espécies *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*, respectivamente. A denominação do gênero originou-se do latim “*fungus bacterium*”, pelo fato do *M. tuberculosis* apresentar algumas características semelhantes aos fungos quando cultivado em meio líquido¹.

Posteriormente, foram visualizados e isolados, tanto do homem como do meio ambiente, vários outros bacilos com as mesmas características tintoriais do *M. tuberculosis*, entretanto, com diversificações no tempo de crescimento *in vitro*, produção de pigmentos e patogenicidade para aos seres humanos. A partir da década de 90, um número crescente de novas espécies tem sido descritas e até o momento dessa publicação 125 espécies e 11 subespécies são reconhecidas oficialmente². Com exceção do *M. leprae* que não cresce *in vitro*, essas espécies são divididas em dois grupos, as espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* e as Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT)^{1,2,3}.

Os bacilos (Unidades Formadoras de Colônias – UFC) variam de tamanho conforme a espécie de micobactéria (0,2 a 0,7 por 1 a 10 micrômetros) e são constituídos de:

- **Parede celular** – responsável pela morfologia bacilar, tem em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos que são utilizados em testes de identificação das espécies de micobactérias. A ligação de alguns desses lipídios com o corante Fucsina gera complexos que são responsáveis pela característica tintorial de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas, apresentada pelas células bacterianas que são então designadas como **Bacilos Álcool-Ácido Resistentes**. Por esse motivo, na prática clínica e laboratorial são conhecidas e transcritas como **BAAR**. Essa característica tintorial e o aspecto morfológico não permitem a definição da espécie micobacteriana, embora algumas se apresentem morfolologicamente mais espessas e curtas. Assim, para a definição da espécie é preciso que os bacilos sejam isolados em meio de cultivo e identificados por testes fenotípicos e/ou moleculares. É também na parede que se encontra o composto (6-6' dimicolato de trealose) responsável pela película que o *M. tuberculosis* forma em meio de cultivo líquido e o aspecto de corda dos bacilos em esfregaços feitos a partir de cultivos.
- **Membrana citoplasmática** – estrutura que envolve o citoplasma e é responsável pelo transporte e seleção de substâncias, nutrientes e água, além de participar do processo respiratório e da produção de energia. Nessa membrana são sinte-

tizados pigmentos carotenóides e niacina, utilizados nos testes de identificação fenotípica das espécies.

- **Cromossomo** – constituído de ácido desoxiribonucleico (ADN) que codifica todas as características e informações necessárias à sobrevivência e multiplicação da micobactéria.
- **Ribossomos** – corpúsculos espalhados no citoplasma da micobactéria contendo ácido ribonucleico (ARN) e proteínas. Possuem as enzimas necessárias à biossíntese celular, entre elas a responsável pela redução do nitrato a nitrito, uma das provas utilizadas na identificação do *M. tuberculosis*.
- **Grânulos de polifosfato** – estruturas onde ficam armazenados polifosfatos para uso nas atividades energéticas e de multiplicação bacilar. Na visualização microscópica podem aparecer como pequeninos grãos escuros localizados nas extremidades do bacilo.
- **Vacúolos lipídicos** – armazenam lipídeos para uso nas necessidades metabólicas das células.
- **Mesossomos** – encontram-se associados à membrana celular e desempenham função essencial no processo de divisão celular e nas atividades enzimáticas.

As micobactérias são, também, classificadas, conforme sua capacidade de causar doença no homem, em (i) patogênicas, que obrigatoriamente causam doença; (ii) potencialmente patogênicas, que podem causar doença; (iii) raramente patogênicas, nunca ou com extrema raridade causam doença. Mediante essa classificação, as espécies oficialmente reconhecidas e mais comumente isoladas estão distribuídas no Quadro 1.

Quadro 1 Espécies de micobactérias classificadas conforme patogenicidade para seres humanos

PATOGÊNICAS				
<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>			
	<i>M. bovis</i>			
	<i>M. africanum</i>			
	<i>M. microti</i>			
	<i>M. caprae</i>			
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS				
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. avium subsp paratuberculosis</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>
RARAMENTE PATOGÊNICA				
<i>M. agri</i>	<i>M. cooki</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. shimoidei</i>	
<i>M. chitae</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. chubuense</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. sphagni</i>	
<i>M. confluentis</i>	<i>M. gilvum</i>			

Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Estudos taxonômicos demonstraram similaridades fenotípicas, relação de antígenos citoplasmáticos e homologia do ADN, entre as várias espécies oficialmente descritas induzindo, por razões operacionais de diagnóstico, o agrupamento de algumas e suas definições como complexos ou grupos. Assim, oficialmente fazem parte do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) as espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG; *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*. A espécie *M. canetti*, descrita inicialmente por George Canetti em 1969, ainda não foi oficialmente reconhecida como membro do CMTB².

Além do CMTB, tem-se o Complexo *M. avium* (MAC) que agrupa as espécies *M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* e Complexo *M. terrae* as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*.

Recentemente, algumas espécies de crescimento rápido foram reunidas em três grupos: (i) grupo *M. fortuitum* composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* *M. bonicki*; (ii) grupo *M. chelonae* pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* e (iii) grupo *M. smegmatis*, pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. godii*.⁴

As espécies de MNT têm sido isoladas de diversas fontes ambientais (águas, solos, poeiras e materiais vegetais) e/ou de animais. Algumas espécies são encontradas na própria microbiota epidérmica e dos tratos respiratório e gástrico-intestinal dos seres humanos.

Quando responsáveis por processos patológicos em humanos, as MNT podem acometer qualquer tecido dos sistemas ou disseminar-se por todo o organismo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia. Por não serem transmissíveis, não existe obrigatoriedade de notificação, o indicador de incidência no Brasil é desconhecido.

4.2 Referências

- 1 COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. *Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice*. Butter Worth-Heinemann, Oxford, 2nd edition. 139 p, 1997.
- 2 EUZÉBY, J.P. *List of bacterial names with standing in nomenclature*. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>) Acesso em 09 mar 2007.
- 3 GRIFFITH, D.E.; AKSAMIT, T; BROWN-ELLIOTT, B.A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F; HOLLAND, S.M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G.; IADEMARCO, M.F; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; von REYN, C.F; WALLACE, R.J. Jr, WINTHROP, K.; *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 175:367-416, 2007.
4. BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE, R.J. Jr. *Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 15:716-46, 2002.

AMOSTRAS CLÍNICAS

5.1 Descrição

As amostras clínicas enviadas ao laboratório para diagnóstico de micobactérias devem cumprir uma série de condições gerais das quais dependem a qualidade e eficiência dos resultados dos exames: indicação correta da pesquisa de micobactérias, seleção do tipo de amostra mais representativa, cuidado na coleta, transporte, acondicionamento e recepção dessas amostras. Assim, os profissionais envolvidos nas atividades descritas devem ter conhecimento da natureza crítica da manutenção da qualidade da amostra durante todo o processo, incluindo aspectos de biossegurança no seu manuseio¹.

Alguns fatores podem comprometer um exame microbiológico, desde a hipótese diagnóstica mal elaborada, informações mal coletadas, incompletas ou não devidamente interpretadas, requisição inadequada da análise laboratorial, coleta, conservação e transporte inadequados, falha técnica na análise, demora na liberação do resultado e má interpretação dos resultados².

Este capítulo fornece informações práticas para uma apropriada coleta e manuseio de amostras destinadas a análises num laboratório de microbiologia de micobactérias.

5.2 Seleção e tipos de amostras

Antes da coleta de amostra para análise no laboratório, é importante que o sítio anatômico de onde será coletada a amostra seja identificado como sendo representativo do processo de doença ativa^{1,2}.

O diagnóstico laboratorial de micobactérias pode ser realizado a partir de amostras provenientes de vários sítios do corpo humano e, para o diagnóstico da tuberculose, as amostras vão depender da forma de tuberculose que está sendo investigada, se tuberculose pulmonar ou extrapulmonar³.

No Quadro 1 estão descritas as amostras encaminhadas com maior frequência para realização de baciloscopia e cultura para o diagnóstico laboratorial da tuberculose e micobacterioses⁴.

Quadro 1 Tipos de amostras utilizadas no diagnóstico laboratorial da TB

Tuberculose Pulmonar	Tuberculose Extrapulmonar
escarro (espontâneo ou induzido)	urina
lavado brônquico lavado bronco-alveolar	líquidos: pleural, sinovial, peritoneal, pericárdico, ascítico e LCR
fragmento de tecido pulmonar (biópsia pulmonar)	secreções ganglionares e de nódulos
aspirado transtraqueal	fragmentos de tecidos: biópsias cutâneas, de ossos e de órgãos
lavado gástrico	secreções purulentas de pele, nariz, ouvido, olhos, garganta
	sangue e aspirado de medula
	aspirados de gânglios e de tumores

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília. 2001

A grande maioria das amostras é de origem respiratória: escarro (espontâneo ou induzido), lavado bronco-alveolar (LBA), escovado brônquico, fragmentos de tecido pulmonar, aspirado transtraqueal e lavado gástrico.

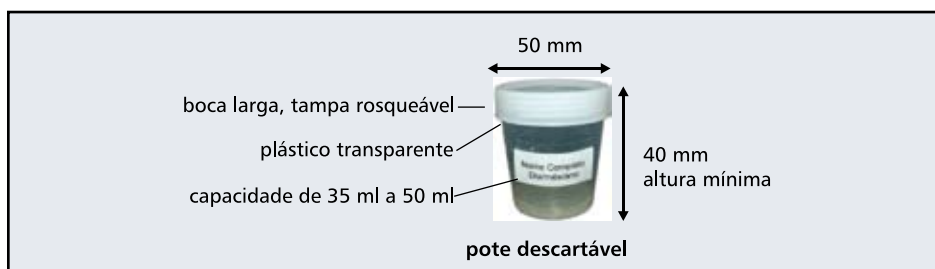
Amostras de sítios não respiratórios são: urina, lesões, secreções, abscessos, líquidos cavitários (líquido céfalo-raquidiano – LCR, pleural, pericárdico, sinovial, ascítico) e outros. Especial atenção deve ser dada quando há suspeita de micobactérias disseminadas, pois nesse caso as amostras serão provenientes de sítios estéreis, como sangue, aspirado de medula óssea, biópsias de gânglios linfáticos, baço e fígado. Nesses casos observar as condições de assepsia da coleta e o acondicionamento em frasco estéril, pois a semeadura será feita diretamente em meio de cultura, não passando pela etapa de descontaminação.

5.3 Amostras de origem pulmonar

As amostras a seguir são as mais freqüentemente solicitadas para o diagnóstico de tuberculose pulmonar^{5,6,7}:

- **Escarro espontâneo** – é a amostra clínica mais utilizada para o isolamento de micobactérias, principalmente para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, por ser o material de maior riqueza bacilar e de fácil obtenção. Uma boa amostra de escarro é a que provém da árvore brônquica, obtida após esforço de tosse (expectoração espontânea) e não a que se obtém da faringe ou por aspiração de secreções nasais e nem tampouco a que contém somente saliva. O volume ideal é de 5 a 10 ml. O escarro contém fragmentos de necrose (caseum), secreções bronco-pulmonares e secreções orofaríngeas, pois, embora a árvore brônquica seja estéril, a expectoração contamina-se ao passar pela parte superior do trato respiratório, assim o escarro é um produto contaminado e viscoso por conter grande quantidade de muco. O escarro deve ser coletado em pote de plástico transparente, de boca larga e com tampa de rosca. As recomendações para a coleta devem ser feitas pelo pessoal da Unidade de Saúde. Por ser um material de maior riqueza bacilar, pode ser conservado em refrigeração (2°C – 8°C), por 5 a 7 dias, sem perder sua viabilidade para a cultura e suas características para a baciloscopia. Transportar para o laboratório, ao abrigo da luz solar e acondicionar de maneira adequada para que não haja risco de derramamento (tampa bem fechada).

O pote para a coleta de escarro deve ser fornecido pela Unidade de Saúde e ter as características de: ser descartável, capacidade de 35 a 50 ml, altura mínima de 40 mm, boca larga e tampa de rosca, como mostra a Figura 1.

Figura 1 Características do pote de coleta de escarro.

Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS/MS.

- **Escarro induzido** – Esse procedimento é recomendado e orientado pelo médico quando o paciente tem pouca secreção ou não consegue coletar normalmente o escarro. A coleta de escarro por indução é feita após a realização de nebulização com solução salina hipertônica (5 ml de NaCl 3%), durante no mínimo 5 e no máximo 20 minutos, preferencialmente com nebulizador ultra-sônico. A nebulização fluidifica a secreção do pulmão, provoca uma irritação que leva à tosse e facilita a expulsão do escarro. Esse procedimento deve ser acompanhado por profissional treinado e em Unidade de Saúde equipada com sala especial e cuidados de biossegurança para prevenir a contaminação do ambiente pelos aerossóis formados. No pote de coleta deve constar a informação de que a coleta foi por indução, pois o material é menos viscoso e semelhante à saliva. Esse procedimento é útil para pacientes em controle de tratamento e pacientes com Aids. Segue as mesmas recomendações de transporte e conservação para o escarro espontâneo.
- **Lavado brônquico ou broncoalveolar (LBA)** – são coletados sob orientação de equipe médica especializada, durante o momento da exploração broncoscópica (broncofibroscópio), em frasco estéril, com um volume de mais de 5 ml e transportados, à temperatura ambiente, com o cuidado de manter a tampa bem fechada para não derramar. O tempo de transporte deve ser no máximo de 4 horas.

ATENÇÃO: O broncofibroscópio deve ser esterilizado conforme indicação do fabricante para evitar contaminação entre pacientes.

- **Aspirado transtraqueal** – deve ser coletado o maior volume possível em recipiente estéril, por equipe médica especializada. Transportar à temperatura ambiente com o cuidado de manter o frasco bem fechado, num tempo inferior a 2 horas.
- **Lavado gástrico** – a obtenção desse material requer hospitalização, pois é coletado logo que o paciente acorda, antes mesmo de se levantar e comer. Indicado para crianças, pois essas deglutem o escarro. Considerado material respiratório,

pois se faz indução do escarro, com sonda nasogástrica fina, injetando 10 a 15 ml de soro fisiológico e, após 30 minutos, é feita lavagem gástrica. Coletar pelo menos duas amostras em dias consecutivos. Pode ser coletado em frasco estéril contendo solução tampão de carbonato de sódio a 10% para neutralizar a ação do suco gástrico e transportado à temperatura ambiente em até 1 hora, em frascos bem fechados. Recomenda-se agendamento entre a instituição que realizará a coleta e o laboratório, para que o laboratório possa organizar-se e processar imediatamente o material.

No item 5.12.2 do anexo deste capítulo, o Quadro 2 resume as recomendações técnicas para as amostras de origem pulmonar.

5.4 Amostras de origem extrapulmonar

As amostras a seguir são as mais freqüentemente solicitadas para o diagnóstico de tuberculose extrapulmonar ^{5,6,7}:

- **Urina** – é um material rico em microbiota associada e o processamento deve ser executado o mais rapidamente possível. Deve-se coletar toda a urina da primeira micção da manhã em frasco estéril, de boca larga, após higiene íntima com água e sabão neutro, com volume mínimo de 40 ml. Utiliza-se um número mínimo de três e máximo de seis amostras, coletadas em dias consecutivos. Transportar com o cuidado de manter a tampa bem fechada para não derramar, à temperatura ambiente num período máximo de 2 horas. Recomenda-se a organização de um fluxo para que o laboratório processe imediatamente o material.
- **Líquido corporal asséptico**: pleural, peritoneal, sinovial, ascítico, pericárdico – esses materiais são coletados assepticamente por pessoal médico, no maior volume possível e colocados em frascos estéreis. Transportar com o cuidado de manter o frasco bem fechado, num tempo de 15 minutos, à temperatura ambiente.
- **Líquido Cefalorraquidiano (LCR)** – é o material indicado para o diagnóstico de meningite tuberculosa. Deve ser coletado pelo médico, por punção lombar, assepticamente, em um volume mínimo de 5 ml (volumes menores comprometem o rendimento da baciloscopia e da cultura). Transportar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado.
- **Fragmentos de tecidos (biópsias)** – os materiais obtidos por dissecação, ou seja, os fragmentos de tecidos (biópsias cutâneas, de órgãos e de ossos), secreções ganglionares e nódulos são coletados assepticamente por pessoal médico, em frascos com Água destilada (ou solução salina) estéril. Não utilizar conservantes ou fixadores como formol. Na suspeita de tuberculose pleural o fragmento de pleura deve ser coletado sempre que possível, pois apresenta positividade superior a cultura do líquido pleural. Devem ser transportados à temperatura ambiente

num período de 15 minutos, em frascos bem fechados. Os raspados de pele ou de lesões superficiais secas têm pouco valor no diagnóstico de micobactérias, com rendimento de isolamento não satisfatório e devem ser considerados somente em última instância. Para o diagnóstico de TB cutânea utiliza-se a biópsia cutânea, pois as micobactérias estão localizadas na hipoderme, obtida apenas pela realização de uma biópsia profunda.

- **Sangue** – a pesquisa de micobactérias no sangue está particularmente indicada nos casos de bacteremia, em pacientes imunodeficientes, por exemplo em pacientes com Aids. Se houver a disponibilidade do frasco de meio de cultura no momento e local da coleta, o sangue deverá ser coletado sem anticoagulante, pois os meios de cultura líquidos já contêm o anticoagulante na sua formulação. De preferência utilizar meios de cultura que são incubados em sistemas semi-automatizados ou automatizados. Na impossibilidade de existir os meios de cultura no momento da coleta, o sangue deverá ser coletado com anticoagulante (com exceção do EDTA) e levado ao laboratório imediatamente. O uso de *Sodium polyanethol sulfonate* (SPS) é recomendado por ser o anticoagulante menos tóxico para micobactérias (1,5 ml de SPS a 0,35% para 8,5 ml de sangue). Transportar à temperatura ambiente (nunca refrigerar), com o cuidado de manter o frasco bem fechado. O sangue menstrual não é mais utilizado para o diagnóstico de tuberculose uterina, sendo a biópsia de endométrio o material mais indicado.
- **Medula óssea** – além da amostra de sangue, o aspirado de medula óssea tem bom rendimento no isolamento de micobactérias de casos disseminados. Deve ser coletado o maior volume possível, em seringa ou frasco estéril, preferencialmente com anticoagulante (evitando o EDTA). No caso de fragmento, deve ser coletado e guardado em frasco com soro fisiológico ou Água destilada estéril. Em ambos não se deve usar conservante ou fixador. Transportar à temperatura ambiente (nunca refrigerar), com o cuidado de manter o frasco bem fechado. Assim como o sangue, recomenda-se a semeadura direta no meio de cultura.
- **Pus e secreções purulentas, aspirado de gânglios e de tumores** – secreções purulentas de pele, nariz, ouvido, olhos, garganta também podem ser utilizados para isolamento de micobactérias. Esses materiais quando provenientes de cavidade fechada são coletados através de punção, por pessoal médico e são semeados diretamente em meio de cultura. Quando o material é de cavidade aberta, geralmente é coletado através de um *swab*, com cuidados especiais de não tocar nas bordas. Nesse caso, o *swab* deve ser imerso em Água destilada ou solução salina, estéreis. Transportar à temperatura ambiente num período inferior a 2 horas.

- **Fezes** – para o caso de diagnóstico de tuberculose intestinal, é indicada a biópsia. A conduta de escolha é a laparotomia, através da colonoscopia. A pesquisa de micobactérias em fezes é apenas indicada para pacientes com Aids e deve ser criteriosamente avaliada pelo médico. Coletar em frasco estéril, sem conservantes ou fixadores e transportar à temperatura ambiente num período menor de 1 hora e com o cuidado de fechar bem o pote.

No item 5.12.3 do anexo deste capítulo, o Quadro 3 resume as recomendações técnicas para as amostras de origem extrapulmonar.

5.5 Solicitação de exames

As amostras clínicas encaminhadas ao laboratório devem estar acompanhadas da solicitação de exames, que é um formulário com informações úteis tanto para quem está solicitando o exame como para o laboratório que irá processar a amostra. As requisições devem estar preenchidas completa e corretamente e devem conter, no mínimo, os seguintes dados, que podem ser valorizados em diferentes etapas do processamento do exame³.

- **Identificação do paciente:** nome e sobrenome completos sem abreviação; data de nascimento para evitar confusão com homônimos; idade atual; nome da mãe; gênero; número do cartão do SUS, endereço completo e telefone para contato.
- **Local da consulta e registro:** número do Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde (CNES), ambulatório, hospital ou consultório e registro do paciente (prontuário), nome e assinatura do solicitante.
- **Informações sobre o paciente:** hipótese diagnóstica, descrição objetiva dos achados clínicos significativos do local e características da infecção, dados epidemiológicos relevantes do provável local de infecção, dados importantes relacionados a processos invasivos (cirurgia, cateter, sonda vesical, diálise), uso de medicamentos (início do tratamento), co-morbidades.
- **Caracterização da amostra:** respiratória (trato respiratório inferior) ou não respiratória (extrapulmonar), qual o sítio e o tipo de via de obtenção do material (punção, *swab*, raspado, drenagem, fístula), data da coleta.
- **Aspectos físicos da amostra:** o escarro pode se apresentar como saliva, mucopurulento, sanguinolento ou liquefeito. Essas informações auxiliam para uma boa interpretação do resultado.
- **Natureza do exame solicitado:** exame microscópico direto (baciloscopia) e/ou cultura; outros (identificação da espécie e teste de sensibilidade).

O envolvimento do médico ou de quem solicita o exame e o laboratório é útil para ambos, facilitando a interpretação de resultados, propiciando melhor orientação técnica e mais objetividade.

Nos itens 1.9.2 e 1.9.4 dos anexos do Capítulo 1 apresentamos modelos de solicitação de exames para baciloscopia e cultura para micobactérias incluindo espaço para os resultados correspondentes e demais informações.

5.6 Considerações gerais para coleta e armazenamento de amostras clínicas

O profissional responsável pela coleta será também responsável pela identificação de forma legível e correta do frasco que contém a amostra a ser encaminhada ao laboratório. Esse profissional deve estar devidamente capacitado e seu conhecimento deve ser periodicamente atualizado para essa atividade. Deve saber que o material deverá ser destinado, o mais brevemente possível, ao laboratório. Deve conhecer ou obter instruções sobre a conservação e/ou transporte do material caso esse não possa ser processado imediatamente³.

Algumas considerações gerais podem ser apontadas, principalmente no caso de solicitação de cultura.

- Coletar a amostra antes de iniciar o tratamento, preferencialmente.
- Instruir claramente o paciente sobre o procedimento da coleta.
- Observar a anti-sepsia na coleta de todos os materiais clínicos.
- Coletar uma quantidade suficiente de material para permitir uma completa análise microbiológica.
- Observar que a solicitação do exame contenha as informações descritas no item 5.5 deste Capítulo.
- Utilizar barreiras de proteção necessárias a cada procedimento.
- Tratar toda amostra como potencialmente patogênica.
- Usar frascos apropriados a cada tipo de coleta e de amostra.
- Não manusear a amostra em trânsito (durante o transporte).
- Não contaminar a superfície externa do frasco de coleta e verificar se está firmemente vedado (caso ocorram respingos ou contaminação na parte externa do frasco, fazer descontaminação com Solução de Fenol a 5%).
- Não contaminar a requisição médica que acompanha o material.
- Colocar a identificação no frasco de coleta e nunca na tampa ou sobre rótulos.

ATENÇÃO: Infecções pós-cirúrgicas conseqüentes de cirurgias estéticas, procedimentos cirúrgicos-endoscópicos ou procedimentos transcutâneos em cavidades ou tecidos estéreis que atinjam dois ou mais pacientes podem caracterizar casos de surtos de MNT de crescimento rápido. As manifestações clínicas podem ser infecções de pele e subcutâneas que se apresentam como abscessos frios

e/ou piogênicos, com reação inflamatória aguda e supuração, ou evolução crônica ou com nódulos; ulcerações nos portais de entrada de cânulas ou laparoscópios; fistulizações; abscessos com secreções com manifestação até um ano após o ato cirúrgico. As amostras clínicas utilizadas para identificação da micobactéria, no caso de surtos, devem ser exsudatos de abscessos e fragmentos de tecidos, coletados através de punção e/ou biópsia e colocado em soro fisiológico ou água destilada estéril. Manter sob refrigeração e não colocar em formol. Não utilizar tecido externo ou material coletado com swab. Recomenda-se não fazer punções repetidas, para evitar contaminações e infecções cruzadas⁸.

O encaminhamento de amostras imediatamente após a coleta assegura a sobrevivência e isolamento do microrganismo, evitando o contato prolongado das micobactérias com a microbiota associada. Observar a rotina de encaminhamento ao laboratório, quanto ao horário de envio e sempre que houver uma situação especial, consultar o laboratório antes de enviar. Os cuidados de acondicionamento e transporte estão descritos no Capítulo 3.

5.7 Orientações para coleta de escarro espontâneo

De acordo com as recomendações da OMS devem ser coletadas duas amostras de escarro de cada paciente para aumentar as chances de se obter um resultado positivo, uma vez que a quantidade de bacilos no escarro é variável⁹.

A primeira amostra deve ser coletada quando o paciente sintomático respiratório procurar o atendimento na Unidade de Saúde, para aproveitar a presença dele e garantir a realização do exame laboratorial. Não é necessário estar em jejum, porém é importante que a boca esteja limpa e sem resíduos de alimentos. Uma boa amostra de escarro consta de material proveniente da árvore brônquica, e contém quantidades mínimas de material originado no nariz e na boca.

A segunda amostra deve ser coletada na manhã seguinte, assim que o paciente despertar. Essa amostra, geralmente é mais rica em bacilos porque é composta da secreção acumulada na árvore brônquica por toda a noite. O paciente deve estar em jejum e realizar bochecho com água para a retirada de resíduos da orofaringe.

Recomenda-se que as amostras sejam coletadas em locais abertos, de preferência ao ar livre. Se a coleta for realizada em uma sala, esta deverá ser arejada, tendo as janelas abertas para reduzir a concentração de partículas infectantes, os núcleos de Wells (partículas de 1 a 5 μm com 1 a 2 bacilos, que ficam suspensas no ar). A porta deverá permanecer fechada durante a coleta, dessa forma o fluxo de ar será direcionado para fora do ambiente através da janela.

Para que a qualidade do material seja satisfatória é necessária que contenha material mucopurulento. Isto é mais importante que o volume. Em condições ideais uma amostra de escarro deve ter um volume de 5 a 10 ml, porém são aceitáveis amostras menores se a qualidade é satisfatória. As amostras coletadas para o controle do tratamento devem ser examinadas independentemente da qualidade e quantidade. E deve persistir durante todo o período que o paciente esteja recebendo a medicação.

Outro aspecto importante que influencia na qualidade da amostra de escarro espontâneo é a maneira como o profissional transmite essas instruções e a compreensão destas pelo paciente. Além do conteúdo falado é fundamental a linguagem não-verbal: dirigir-se ao paciente pelo nome, cumprimentá-lo, aproximar-se para atendê-lo, manter contato visual quando a ele se dirigir ou quando este se dirigir ao profissional, concentrar-se no paciente e manter a fisionomia receptiva. O profissional de saúde deverá ter sempre a preocupação de avaliar a compreensão das informações dadas, mudando a linguagem quando necessitar repetir a orientação, além de sempre deixar espaço para que o paciente possa fazer perguntas¹⁰.

Antes de iniciar as orientações, o profissional deve reunir todo o material necessário, bem como verificar se a tampa do pote fecha bem e se o mesmo está devidamente identificado (nome e data da coleta) no corpo do pote. A seguir estão os passos para orientar o paciente a coletar uma boa amostra de escarro¹⁰.

- Explicar a importância do exame para o paciente utilizando termos claros e de fácil entendimento.
- Fornecer ao paciente a orientação e simulação da técnica de coleta utilizando para isso o pote, aproveitando este momento para indicar a quantidade a ser coletada.
- Orientar o paciente a inspirar profundamente, retendo por alguns instantes o ar dos pulmões. Orientar o paciente a tossir e escarrar diretamente no pote.
- Orientar a repetir esse procedimento por três vezes, até atingir a quantidade necessária ao exame (5 a 10 ml), tendo o cuidado para que o material não escorra por fora do pote.
- Orientar o paciente a tampar o pote rosqueando-o firmemente.
- Entregar ao paciente o pote para a coleta (identificado), junto com um papel-toalha (ou papel higiênico).
- Indicar ao paciente o local da coleta.
- Após a coleta o paciente deve levar o pote até o profissional de saúde, que deve verificar a quantidade e a qualidade da amostra, sem abrir o pote. Caso a quantidade seja insuficiente, deve-se pedir para o paciente repetir a operação até obter uma amostra adequada.
- Ao final, o paciente deve lavar as mãos.

Nos itens 5.12.6 e 5.12.7 do anexo deste capítulo apresentamos modelos de cartazes com as orientações para coleta de amostras de escarro espontâneo. Recomendamos que o cartaz da coleta da 1ª amostra esteja afixado nas Unidades de Saúde e que o da 2ª amostra seja impresso e entregue ao paciente.

5.8 Instruções para coleta de escarro induzido

Quando o paciente não consegue coletar normalmente (espontaneamente) o escarro, porque não consegue expelir o escarro ou tem pouca secreção, recomenda-se a obtenção de uma amostra de escarro através de indução.

A técnica consiste na nebulização com solução salina hipertônica (5 ml de NaCl 3 – 5%), preferencialmente com nebulizador ultra-sônico, em uma sala especial que atenda às normas de biossegurança e o profissional que executa a técnica deve estar habilitado para tal. Os pacientes devem ser rigorosamente agendados com intervalos mínimos de uma hora. Seguir as orientações padronizadas para coleta de escarro e envio ao laboratório.

Para obtenção da solução a 3%, utilizar o seguinte recurso: usar 5 ml de Soro Fisiológico 0,9% + 0,5 ml de NaCl 20%. Não utilizar solução preparada com Água destilada e NaCl pois pode causar broncoespasmo, dificultando ainda mais a expectoração¹¹.

A técnica de indução do escarro é um procedimento com melhor relação custo-benefício para o diagnóstico da TB pulmonar com escarro negativo, sendo seu uso recomendado, sempre associado com a baciloscopia e a cultura para micobactérias, precedendo a métodos invasivos, como a broncofibroscopia¹¹.

5.9 Recepção de amostras no laboratório

O laboratório não deve ter horário restrito para recepção de amostras. O profissional responsável pela rotina de recebimento deverá utilizar equipamentos de proteção individuais (EPI) ao receber as amostras. Na recepção, junto com o profissional que trouxe a amostra, é importante verificar as seguintes observações.

- Comprovar se as amostras estão bem identificadas e correspondem às requisições enviadas.
- Proceder o registro de cada amostra no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) e no Registro de Baciloscopia e/ou Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade, anotando as características de cada amostra, principalmente as amostras de escarro, de acordo com o item 5.5 deste Capítulo.

Informar o prazo de entrega do resultado de acordo com o exame solicitado.

- Se houver deficiências que podem influenciar a qualidade e/ou quantidade da amostra e a forma em que foram enviadas, registrar e comunicar à Unidade de

Saúde remetente para esclarecimentos sobre as condições da amostra e solicitar nova coleta, quando necessário.

- Recomenda-se que nenhuma amostra clínica seja desprezada, mesmo em situações em que haja problemas referentes à qualidade, quantidade e forma de envio, sem o prévio conhecimento do paciente e do solicitante do exame, salvo em caso de acidente (que também deve ser notificado). Notificar o serviço que enviou as amostras sobre quaisquer problemas referentes à qualidade, quantidade e forma de envio.

5.10 Controle de qualidade

5.10.1 Recebimento de amostras

O recebimento criterioso de amostras pelo laboratório garante uma melhor correlação clínico/laboratorial. Esses critérios devem ser respeitados desde a recepção até o processamento das amostras³.

Cada tipo de amostra requer especiais condições de coleta, frascos apropriados, conservação e transporte. Nos quadros apresentados nos itens 5.12.2 e 5.12.3 do anexo deste capítulo estão as principais amostras pulmonares e extrapulmonares, solicitadas para o diagnóstico de micobactérias e as características especiais de cada uma delas.

Algumas situações são comuns na rotina dos laboratórios, como a chegada de amostras não identificadas, com tempo prolongado de transporte, frascos não apropriados, frascos quebrados ou com vazamento, amostras não próprias para a hipótese clínica. Sempre que esses problemas forem encontrados, é importante informar o local de origem e solicitar esclarecimentos, registrar a ocorrência e as providências tomadas em cada situação. Essas práticas asseguram a qualidade dos exames realizados.

No item 5.12.7 apresentamos um formulário para registro das inadequações encontradas no recebimento das amostras clínicas e as providências tomadas para solucionar o problema.

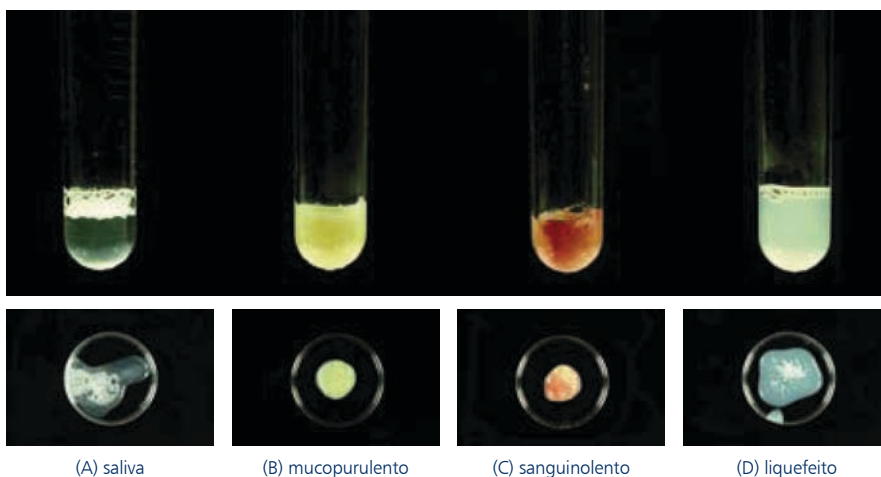
5.10.2 Aspectos físicos do escarro

O escarro contém partículas sólidas ou purulentas produzidas pelos pulmões, que são expelidas junto com a tosse, e a Figura 2 mostra como elas podem se apresentar como saliva, mucopurulento, sanguinolento e liquefeito¹².

Recomenda-se não deixar o escarro por muito tempo à temperatura ambiente, pois isso pode torná-lo liquefeito, com aspecto muco-coloidal ou aguado. Normalmente, a parte sanguinolenta contém menos bacilos porque o sangue contata pouco tempo a lesão.

A saliva e o muco nasal não são boas amostras para serem examinadas, mas não devem ser desprezadas, pois existe a possibilidade de que se encontrem bacilos.

Figura 2 Aspectos físicos do escarro



(A) saliva (B) mucopurulento (C) sanguinolento (D) liquefeito
 Fonte: Adaptado de Fujiki A. AFB Microscopy Training. Tokyo, Japan: The Research Institute of Tuberculosis, 2005.

5.10.3 Qualidade das amostras de escarro espontâneo⁴

Para avaliar a qualidade das amostras de escarro espontâneo recebidas para diagnóstico e a necessidade ou não de capacitar o técnico que orienta o paciente para a coleta, é importante calcular o seguinte indicador: percentual das amostras com aspecto de saliva, no período em avaliação. É recomendado fazer essa avaliação trimestralmente e a fonte dos dados é o sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL e Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade.

O método de cálculo é:

$$\frac{\text{Nº de amostras de escarro recebidas com aspecto de saliva em determinado período}}{\text{Total de amostras recebidas no laboratório no mesmo período}} \times 100$$

Para interpretar o resultado, o parâmetro utilizado é 15%. Um percentual maior do que 15% pode indicar que não estão sendo dadas as orientações adequadas para a coleta de escarro ou que os pacientes só conseguem produzir amostras com aspecto de saliva. Enquanto que um percentual igual ou menor do que 15% indicam que as amostras estão sendo coletadas adequadamente.

Exemplo: No período de 2 de janeiro a 2 de abril do ano corrente, foram recebidas 400 amostras de escarro para diagnóstico com aspecto de saliva. O número total de amostras recebidas para diagnóstico, no mesmo período, foi de 1440. Fazendo o cálculo, o percentual foi de 27,7%.

Nesse caso, as possíveis causas para um valor acima de 15% podem ser: orientação inadequada ao paciente para a coleta de escarro ou o estágio da doença é inicial ou o paciente tem pouca expectoração (paciente HIV/Aids) ou amostras coletadas por indução. Para corrigir é necessário treinar o técnico responsável pela orientação ao

paciente e/ou melhorar as instruções fornecidas por escrito. Lembrar de não incluir no cálculo as amostras de escarro coletadas por indução.

5.11 Referências

- 1 SEIC/Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005. *Procedimientos em Microbiologia Clínica*. Micobactérias. Parte 9ª. Disponível em <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>. (consulta 25.09.05).
- 2 MILLER, J.M.; HOLMES, H.T.; KRISHER, K. *General Principles of Specimen Collection and Handling*. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenenbaum (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. ASM Press, Washington, D.C.- USA. 2003.
- 3 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica*. Módulos III, IV e VI. 2005.
- 4 BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. *Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia*. Brasília. 2001.
- 5 ATS/American Thoracic Society. *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children*. Am J. Respir Crit Care Med, vol 161, p. 1376-1395. 2000.
- 6 PFYFFER, G.E.; BROWN-ELLIOT, B.A.; and WALLACE, Jr. R.J. *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures*. Chapter 36, p. 532-559. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenenbaum (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. ASM Press, Washington, D.C.-USA, 2003.
- 7 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 3ª Edição comemorativa. Rio de Janeiro. 2005.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota Técnica Nº 2/DEVEP/SVS/MS: Ocorrência de surtos de infecções por Mycobacterium não tuberculosis pós-cirúrgicas no Rio de Janeiro/RJ. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/SAUDE>.
- 9 WHO/ World Health Organization. Laboratory Services in tuberculosis control. PartIII: Culture. Geneva, Switzerland, WHO/TB/98.258. 1998.
- 10 CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROF. ALEXANDRE VRANJAC”. Divisão de Tuberculose. *Manual de orientação para coleta de amostras de escarro e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose*. São Paulo, 26p. 2002.
- 11 SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. *II Diretrizes Brasileiras para a Tuberculose*. J Bras Pneumol; 30 (Supl 1). 2004.
- 12 FUJIKI, A. *AFB Microscopy Training*. “Good Quality Smear Examination makes a Good Quality TB Control Programme” Tokyo, Japan: The Research Institute of Tuberculosis. 2005.

5.12 Anexos do capítulo

5.12.1 Quadro 2 – Recomendações Técnicas para Amostras de Origem Pulmonar

AMOSTRAS DE ORIGEM PULMONAR					
TIPO DE AMOSTRA	COLETA		TEMPO E TEMPERATURA		COMENTÁRIOS
	ORIENTAÇÃO	RECIPIENTE	TRANSPORTE	ARMAZENAMENTO	
Escarro espontâneo	- lavar a boca / bochechos local arejado, ar livre - abrir o pote - forçar a tosse: inspirar profundamente, prender a respiração, escarrar no pote	pote plástico, tampa de rosca, boca larga (50 mm diâmetro), capacidade para 35 a 50 ml, descartável volume 5 a 10 ml	≤ 2 horas temperatura ambiente abrigo da luz	≤ 7 dias 4°C	- 1ª amostra coletada na Unidade de Saúde, no momento da consulta - 2ª amostra coletada na manhã seguinte ao despertar - coletar em 2 dias consecutivos
Escarro induzido	- sala equipada com cuidados de biossegurança para evitar contaminação do ambiente. - acompanhamento de técnico treinado. - dia anterior – ingerir muito líquido - nebulização com solução salina hipertônica a 3%, durante 5 a 20 minutos. - seguir as mesmas instruções do escarro espontâneo	pote plástico, tampa de rosca, boca larga (50 mm diâmetro), capacidade para 35 a 50 ml, descartável volume 5 a 10 ml	≤ 2 horas temperatura ambiente abrigo da luz	≤ 7 dias 4°C	- indicado quando o paciente tem pouca secreção ou não consegue expelir - a nebulização fluidifica a secreção do pulmão e provoca irritação que leva à tosse e expulsão do escarro - amostra é menos viscosa e semelhante à saliva - escrever no pote “escarro induzido”
Lavado Brônquico Escovado Brônquico Lavado Bronco-alveolar (LBA) Aspirado transtraqueal	- sob orientação médica - uso de broncofibroscópio - uso de substância anestésica é letal para micobactéria - sala deve ter cuidados de biossegurança para evitar contaminação do ambiente	frasco estéril próprio volume mínimo 5 ml	≤ 2 horas temperatura ambiente abrigo da luz	≤ 24 horas 4°C	- procedimento invasivo - processar imediatamente - esterilizar o broncofibroscópio - anestésico inibe o crescimento bacteriano - evitar a contaminação com o trato respiratório superior - coleta da secreção após o uso do aparelho pode ser recolhida até 2 dias depois
Fragmentos de tecidos pulmonares	- sob orientação médica - usar solução fisiológica ou Água destilada - não usar formol	biópsias – 1 g de tecido ou 3 a 4 mm	≤ 2 horas, temperatura ambiente abrigo da luz	≤ 24 horas, temperatura ambiente > 24 horas, congelar	- processar imediatamente - evitar o ressecamento
Lavado gástrico	- jejum de 8 a 10 horas - colhido logo ao acordar, antes de levantar. - crianças antes de ver a mãe para evitar deglutição pelo estímulo visual - realizado com sonda nasogástrica fina, introduzida pela boca ou nariz - injeta 10 a 15 ml de solução fisiológica - após 30 minutos faz lavagem gástrica	sonda gástrica frasco estéril volume 50 ml	≤ 15 minutos temperatura ambiente ou neutralizar em 1 hora de coleta	≤ 4 horas 4°C	- requer hospitalização - crianças: 40% de positividade com evidência da doença ao RX - neutralizar o suco gástrico com carbonato de sódio 1 mg/1 ml de lavado gástrico - 2 dias consecutivos - laboratório deve processar em até 4 horas

Fonte: Adaptado de Miller, J. M.; Holmes, H. T.; Kirsner K. General Principles of Specimen Collection and Handling. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenen (ed.), Manual of Clinical Microbiology. 8ª Edition. ASM Press, Washington, D.C.-USA. 2003.

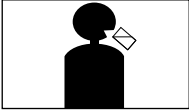
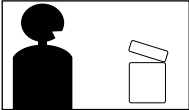
5.12.2 Quadro 3 – Recomendações Técnicas para Amostras de Origem Extrapulmonar

AMOSTRAS DE ORIGEM EXTRAPULMONAR					
TIPO DE AMOSTRA	COLETA		TEMPO E TEMPERATURA		COMENTÁRIOS
	ORIENTAÇÃO	RECIPIENTE	TRANSPORTE	ARMAZENAMENTO	
Urina	- após higiene com água e sabão neutro - toda a urina da 1ª micção da manhã - levar imediatamente ao laboratório	- frasco estéril de boca larga com tampa de rosca - volume mínimo de 40 ml	≤ 2 horas temperatura ambiente	≤ 4 horas, ou centrifugar e armazenar precipitado neutralizado refrigerar 4°C	- material rico em microbiota associada - não aceitar <i>pool</i> de amostras colhidas em 24 horas - não aceitar volumes inferiores a 40 ml - coletar 3 a 6 amostras em dias consecutivos
Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	- realizada por procedimento médico - recomendado jejum - punção lombar	- frasco estéril - volume mínimo 5 ml	≤ 15 minutos temperatura ambiente	≤ 24 horas temperatura ambiente	- material estéril - suspeita de meningite tuberculosa - coleta em hospitais
Líquido pleural Líquido sinovial Líquido peritoneal	- realizada por procedimento médico - punção pela via percutânea ou cirúrgica - não usar conservantes ou fixadores	- frasco estéril - volume ≥ 10 ml	≤ 15 minutos temperatura ambiente	≤ 24 horas temperatura ambiente	- líquidos orgânicos estéreis - coletados em hospitais ou clínicas especializadas
Fragmentos cutâneos e ósseos	- realizada por procedimento médico - usar solução fisiológica ou Água destilada	- frascos estéreis - não usar formol	≤ 15 minutos temperatura ambiente	≤ 24 horas temperatura ambiente	- podem ser estéreis ou não - biópsia de pleura tem positividade maior - amostras de pele devem ser incubadas em temperaturas diferentes
Fragmentos de órgãos	- realizada por procedimento médico - usar solução fisiológica ou Água destilada	- frascos estéreis - não usar formol	≤ 15 minutos temperatura ambiente	≤ 24 horas temperatura ambiente	- podem ser estéreis ou não - biópsia de pleura tem positividade maior do que o líquido pleural
Sangue e Aspirado de medula	- para o aspirado de medula, a coleta deve ser por equipe médica - com anticoagulante (SPS)	- punção venosa - inocular diretamente em frasco de meio de cultura - ou frasco estéril	≤ 2 horas temperatura ambiente	≤ 24 horas temperatura ambiente	- nunca refrigerar - para os casos de micobactérias disseminadas - não usar EDTA como anticoagulante
Pus e secreções	- de cavidades fechadas: por punção - de cavidades abertas: com <i>swab</i>	- frasco estéril - <i>swab</i> imerso	≤ 2 horas temperatura ambiente	≤ 24 horas temperatura ambiente	- de preferência aspirar ou passar o <i>swab</i> na parte mais profunda da lesão
Fezes	- de preferência, antes da medicação	- pote de boca larga - sem conservante	≤ 1 hora temperatura ambiente	≤ 24 horas refrigerar 4°C	- avaliação criteriosa pelo médico - indicada para pacientes com Aids

Fonte: Adaptado de Miller, J. M.; Holmes, H. T.; Krisher K. General Principles of Specimen Collection and Handling.
In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller (ed.), Manual of Clinical Microbiology
8th Edition. ASM Press, Washington, D.C.-USA. 2003.

5.12.3 Orientações para coleta de escarro – 1ª amostra

Coleta da primeira amostra na unidade de saúde

1. **lave** a boca fazendo bochechos com bastante água. **Não** precisa estar de jejum;
3. **abra** o pote fornecido pela unidade de saúde.
2. fique **sozinho** em um local arejado, de preferência ao ar livre;

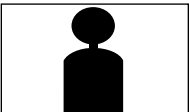
4. force a **tosse**, do seguinte modo:

a) **inspire** profundamente, isto é, **puxe** o ar pelo nariz e fique com a boca fechada; **prenda** a respiração por alguns instantes e **solte** o ar **lentamente** pela boca. **Faça** isso mais duas vezes.

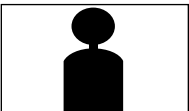




b) **inspire** profundamente mais uma vez, **prenda** a respiração por alguns instantes e **solte** o ar com **força** e **rapidamente** pela boca;


c) **inspire** profundamente mais uma vez, **prenda** a respiração por alguns instantes e, em seguida, **force** a tosse para poder liberar o escarro que está dentro do pulmão.

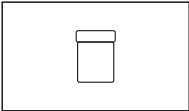






5. **escarre** diretamente dentro do pote. **Cuidado** para o escarro não escorrer por fora;

6. **repita** as orientações 4 e 5 **por mais duas vezes**, até conseguir uma quantidade maior de amostra;

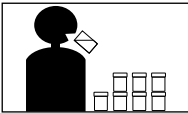
7. feche **firmente**, **proteja** da luz solar, **carregue** sempre com tampa voltada para cima e **entregue** o pote para o profissional que orientou você.



Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília. 2001.

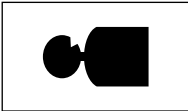
5.12.4 Orientações para Coleta de Escarro – 2ª amostra

Coleta da segunda amostra
Para coletar a segunda amostra é importante que você:



1. no dia anterior à coleta

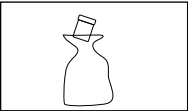
a) beba no mínimo 8 copos de líquidos (água, refrescos). A água ajuda a soltar o escarro que está no pulmão;



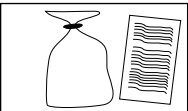
b) durma sem travesseiro. Isso também facilita a saída do escarro do pulmão, na hora da coleta.

2. no dia da coleta e assim que despertar

a) lave a boca fazendo bochechos com bastante água e, em jejum, force a tosse e escarre dentro do pote, seguindo as mesmas orientações da coleta da primeira amostra;



b) feche firmemente, coloque num saco plástico, proteja da luz solar, carregue sempre com a tampa voltada para cima e leve o pote imediatamente para o laboratório ou unidade de saúde.



c) leve também a requisição mas fora do saco plástico onde está o pote.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília. 2001.

5.12.5 Formulário de registro de inadequações no recebimento de amostras clínicas



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Registro de Inadequações no Recebimento de Amostras Clínicas

Identificação		
Data de Entrada no Laboratório: ____/____/____	Horário da entrada:	Nº Geral:
Unidade de Saúde:	Telefone:	
Nome do Paciente:	Telefone:	
Responsável na Recepção:	Responsável no Laboratório:	
Motivo da Não Conformidade		
Erros de Identificação		Amostras Inadequadas
☐ Discrepância entre a identificação da amostra e a requisição	☐ Tempo prolongado de transporte	
☐ Falta de identificação da amostra	☐ Conservação inadequada (temperatura)	
☐ Origem da amostra não identificada	☐ Amostra não própria para a hipótese clínica	
☐ Tipo de amostra não identificada	☐ Frascos não apropriados	
☐ Exame a ser realizado não identificado	☐ Frascos quebrados ou com vazamento	
☐ Outro:	☐ Outro:	
Providências tomadas		
Data:	Responsável:	

BACILOSCOPIA

6.1 Descrição

A baciloscopia ou exame microscópico é a pesquisa de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado com metodologia padronizada¹.

Apesar dos avanços tecnológicos na micobacteriologia, a baciloscopia, corada pelo método de Ziehl Neelsen e seguindo técnica padronizada de observação ao microscópio de campo claro, mesmo sendo um método de simples execução, continua sendo particularmente importante no combate da tuberculose por ser de baixo custo e por detectar casos bacilíferos, ou seja, casos infecciosos de tuberculose pulmonar, responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão¹.

Dessa forma, no Brasil, para o diagnóstico laboratorial dos pacientes sintomáticos respiratórios (SR) que procuram os serviços de saúde com tosse e expectoração há mais de três semanas e constituem os casos suspeitos de tuberculose, é importante a realização da baciloscopia visando detectar os casos infecciosos de tuberculose pulmonar. No ano de 2005, 64% dos casos novos notificados com tuberculose pulmonar apresentaram baciloscopia positiva².

A baciloscopia de controle é indicada para acompanhar a eficácia do tratamento através da redução bacilar e/ou negatificação do escarro em exames mensais, independentemente do volume da secreção.

A baciloscopia é geralmente considerada um procedimento de diagnóstico com baixa sensibilidade, sendo descrita numa faixa entre 25% a 65% quando comparada com a cultura. O que geralmente não é considerado, entretanto, é que a sensibilidade da baciloscopia varia com o tipo de lesão, o tipo e número de amostras, a atenção e persistência do microscopista. Porém, quando esses fatores são levados em consideração, o diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar pela baciloscopia identifica os casos de TB que são fontes de infecção para a comunidade, com uma sensibilidade de aproximadamente 90%².

O número mínimo de Bacilos Álcool-Ácido Resistente (BAAR) necessário para produzir um esfregaço com resultado positivo tem sido estimado entre 5000 a 10000 por mililitro, conforme descrito no Quadro 1³.

Quadro 1 Número de BAAR observados nas baciloskopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos

NÚMERO DE BACIOS OBSERVADOS	CONCENTRAÇÃO ESTIMADA DE BACIOS POR ML DE ESCARRO	PROBABILIDADE DE UM RESULTADO POSITIVO
0 em 100 ou mais campos	Menos do que 1000	Menos do que 10%
1 – 2 em 300 campos	5000 – 10000	50%
1 – 9 em 100 campos	Aproximadamente 30000	80%
1 – 9 em 10 campos	Aproximadamente 50000	90%
1 – 9 por campos	Aproximadamente 100000	96,2%
10 ou mais por campo	Aproximadamente 500000	99,95%

Fonte: David HL. Bacteriology of mycobacterioses. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Centre, Atlanta, USA, 1996.

O escarro de pacientes com tuberculose pulmonar – particularmente aqueles com lesão cavitária – muitas vezes contém um grande número de BAAR que é facilmente detectado pela microscopia direta. A sensibilidade da baciloscopia pode ser melhorada pela realização de mais de uma amostra por paciente. Muitos estudos têm mostrado que, quando realizadas duas baciloskopias, detectam-se, em média, mais de 90% dos casos infecciosos de TB, nos países de baixa e alta prevalência. Nesse caso, o incremento mostrado tem sido de 80 a 82% a partir da primeira, 10 a 14% a partir da segunda e 5 a 8% a partir da terceira baciloscopia².

6.2 Métodos de execução do esfregaço

Nesse manual, serão descritos dois métodos de execução do esfregaço: o método da baciloscopia direta e o método da baciloscopia com concentração da amostra clínica. O primeiro método utiliza escarro sem tratamento prévio e é recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico laboratorial de todos sintomáticos respiratórios. No segundo, o esfregaço é realizado após tratamento da amostra clínica paucibacilar, e é recomendado para o diagnóstico laboratorial da tuberculose extrapulmonar, da tuberculose infantil, da tuberculose nos pacientes portadores do vírus HIV e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Na rotina laboratorial, a baciloscopia é realizada, na maioria das vezes, com escarro espontâneo, utilizando a porção mais purulenta que é colocada e distendida diretamente sobre a lâmina – baciloscopia direta. As secreções purulentas e o pus, por suas características físicas, também podem ser distendidos diretamente sobre a lâmina. Por outro lado, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da baciloscopia, todas as amostras clínicas, sempre que possível e, de acordo com a necessidade, podem receber tratamento antes da realização do esfregaço. Esse tratamento pode ser: tritura-

ção, digestão com agentes químicos tais como um Hidróxido de sódio ou hipoclorito, concentração, sedimentação, flotação ou mesmo filtração⁴.

6.2.1 Método de execução do esfregaço para baciloscopia direta^{1,6,7}

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança, tais como as boas práticas de laboratório e o uso de EPI adequado, conforme descrito no Capítulo 3.
- Abrir um pote de cada vez e com cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Utilizar a porção mais purulenta do escarro para evitar resultados falso-negativos e utilizar lâminas sem prévio uso para evitar resultados falso-positivos.
- Realizar no máximo 12 amostras de cada vez e manter a área de trabalho com iluminação adequada para evitar a troca de amostras.

Materiais

Equipamentos

- Bico de Bunsen.

Reagentes

- Solução de Álcool a 70%
- Solução Fenol a 5%.

As fórmulas e o preparo dos reagentes acima estão descritos nos anexos do Capítulo 3.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- 2 Bandejas de metal.
- Pinça anatômica com pelo menos 12 cm, ponta arredondada e internamente serrilhada.
- Palito de madeira.
- Lápis de grafite.
- Lâminas de vidro para microscopia de 26 x 76 mm, espessura de 1,2 a 1,4 mm, com borda fosca.
- Recipiente com tampa contendo pedaços de gaze.
- Recipiente de vidro com tampa para colocar as lâminas imersas em álcool etílico.
- Caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

Procedimentos de organização

1. Forrar a bancada com papel-toalha ou outro que tenha capacidade de absorver respingos.
2. Providenciar e organizar na bancada os materiais necessários para preparar o esfregaço.
3. Organizar tudo de forma a assegurar um fluxo de trabalho lógico e seguro. Manter o papel-toalha e o frasco com Solução de Fenol a 5%, à mão na bancada, para desinfecção se houver respingos, conforme descrito no Capítulo 3.
4. Forrar as duas bandejas de metal com papel absorvente. Colocar uma delas na bancada à sua frente. Ela será sua área de trabalho. A segunda bandeja colocar ao lado direito próximo ao bico de Bunsen, para colocar as lâminas com esfregaço para secar.
5. Colocar as amostras clínicas de acordo com o número de ordem de registro, atrás da bandeja de metal a sua frente.
6. Verificar se as lâminas a serem utilizadas estão limpas e não foram usadas previamente. As lâminas arranhadas podem reter a Fucsina e simular a presença dos bacilos. A limpeza da lâmina nova é necessária, pois freqüentemente elas vêm de fábrica, engorduradas pelo polimento. Nesse caso, é preciso:
 - a) Lavar essas lâminas com água e detergente neutro, enxaguá-las bem e depois colocá-las imersas em um recipiente com álcool etílico.
 - b) Secar com gaze as lâminas que vão ser utilizadas.
7. Identificar com o número de registro de cada amostra clínica cada lâmina. Para isso, escrever, com grafite, na borda fosca da lâmina o mesmo número colocado no corpo do pote.
8. Colocar em cima da bandeja de metal somente o pote da amostra que será processada.
9. Colocar a lâmina sobre a bandeja de metal.
10. Colocar o bico de Bunsen entre o técnico e a área de trabalho, tomando cuidado com a chama.

Procedimentos de realização

1. Retirar lentamente a tampa da amostra para evitar a formação de aerossóis e colocar suavemente virada para cima, na bandeja.
2. Quebrar ao meio um palito de madeira.
3. Retirar, com as duas pontas farpadas do palito, a partícula maior e mais purulenta da amostra e depositar na lâmina. Conforme Figura 1. Quando existirem apenas pequenas partículas purulentas ou mucosas, pegar três porções ou mais da amostra, depositá-las na lâmina e homogeneizá-las com a ponta do palito.

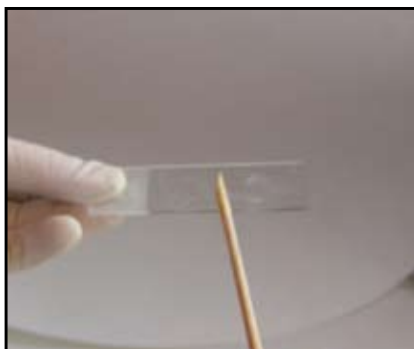
Figura 1 Exemplo de retirada da partícula da amostra de escarro e colocação na lâmina



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

4. Distender a amostra, até o extremo oposto da lâmina com uma das partes do palito em posição horizontal. Com o palito na mesma posição, fazer movimentos de vai e vem em cima da amostra até obter um esfregaço homogêneo que cubra 2/3 da lâmina, sem deixar espaços vazios. Conforme Figura 2.

Figura 2 Preparo do esfregaço



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

Obs.: Não aquecer a lâmina durante a preparação do esfregaço. Esse procedimento é uma fonte importante de formação de aerossóis no ambiente laboratorial e, além disso, produz precipitados granulosos que prejudicam a coloração e a detecção do bacilo⁴.

5. Descartar as duas partes do palito, na caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.
6. Colocar a lâmina com o esfregaço voltado para cima, para secar em temperatura ambiente, na bandeja de metal que está a direita, próximo do bico de Bunsen.

7. Fechar bem o pote da amostra. Os potes com as amostras já processadas devem ficar armazenadas a temperatura de 2 e 8°C, até a liberação dos resultados, para o caso de ser necessário repetir a baciloscopia ou realizar a cultura.
8. Repetir os passos de 1 a 7, até processar todas as amostras.
9. Depois de secas, fixar as lâminas, uma de cada vez, no bico de Bunsen conforme descrito no item 6.3 deste capítulo.

ATENÇÃO: Fixar o esfregaço somente quando as lâminas estiverem completamente secas, conforme descrito no item 6.3 deste capítulo.

10. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.

6.2.2 Método de Execução do Esfregaço para Baciloscopia após Concentração da Amostra Clínica¹

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de EPI adequados conforme descrito no Capítulo 3.
- Realizar os procedimentos de manipulação da amostras em Cabine de Segurança Biológica (CSB).
- Utilizar centrífuga com rotores e adaptadores de tubos (caçapas) com tampa de proteção contra dispersão de aerossóis.
- Observar a capacidade da centrífuga para estabelecer o número de tubos a serem trabalhados a cada lote. A centrífuga deve ser preferencialmente refrigerada para evitar que o aquecimento interfira na viabilidade da micobactéria, no caso da amostra ter também indicação de cultura. Abrir as caçapas da centrífuga dentro da CSB.
- Abrir um pote de cada vez e com cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Utilizar lâminas sem prévio uso para evitar resultados falso-positivos.

ATENÇÃO: As amostras clínicas que além da indicação para baciloscopia também tiverem indicação de cultura, realizar a manipulação das amostras clínicas e execução do esfregaço conforme descrito no Capítulo 7.

Materiais

Equipamentos

- CSB.

- Centrífuga com rotor para tubos de 15, 30 ou 50 ml.
- Agitador mecânico.
- Pipetador automático ou manual.
- Cronômetro.

Reagentes

- Solução de Hidróxido de sódio a 4%.
- Água destilada estéril.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.

A fórmula e o preparo da solução de Hidróxido de sódio a 4% está descrita nos anexos do Capítulo 7 e a fórmula e o preparo da Solução de Álcool a 70% e da Solução de Fenol a 5% estão descritos nos anexos do Capítulo 3.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Pinça anatômica com pelo menos 12 cm, ponta arredondada e internamente serrilhada.
- Palitos de madeira.
- Bandeja de metal.
- Lápis de grafite.
- Lâminas de vidro para microscopia de 26 x 76 mm, espessura de 1,2 a 1,4 mm, com borda fosca.
- Tubos de centrifuga de polipropileno, estéreis, descartáveis, com fundo cônico, de 15, 30 ou 50 ml com tampa de rosca.
- Estante para os tubos de 15, 30 ou 50 ml.
- Pipetas Pasteur estéreis.
- Recipiente com tampa com pedaços de gaze estéril.
- Recipiente de vidro com tampa para colocar as lâminas imersas em álcool etílico.
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.
- Recipiente à prova de respingos contendo Solução de Fenol a 5% num volume que ocupe 2 cm do frasco. Por exemplo: um funil de vidro acoplado à

boca de um frasco Erlenmeyer ou de um balão de vidro (corpo largo e boca estreita).

Procedimentos de organização

1. Identificar o número de registro da amostra clínica no tubo de centrífuga e na lâmina, conforme descrito no item 6.2.1. deste manual.
2. Preparar a CSB conforme descrito no Capítulo 11.

Realizar o procedimento 3 fora da CSB

3. Organizar os potes das amostras, observando a correspondente identificação do número de registro no corpo do pote, no tubo de centrífuga e na lâmina. Colocar os tubos de centrífuga na estante.

Realizar os procedimentos de 4 a 6 dentro da CSB.

4. Organizar os materiais que serão utilizados na CSB conforme descrito no Capítulo 11.
5. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.
6. Colocar as amostras de acordo com o número de ordem de registro, atrás da bandeja.

Procedimentos de realização

Realizar os procedimentos de 1 a 7 dentro da CSB

1. Colocar em cima da bandeja de metal somente o pote da amostra que será processada.
2. Se a amostra clínica tiver indicação somente para baciloscopia, transferir a amostra para o tubo de centrífuga de 15 ml, deixando escorrer suavemente o escarro pela parede interna do tubo, cuidando para não derramar. Caso escorra o material para fora do tubo, limpar com gaze embebida na Solução de Fenol a 5%.
3. Colocar o tubo de centrífuga contendo a amostra em uma estante.
4. Repetir esse procedimento para todas as amostras.
5. Adicionar, com pipeta estéril a cada um dos tubos de centrífuga, a Solução de NaOH a 4%, na quantidade correspondente ao mesmo volume da amostra. Usar uma pipeta para cada amostra.
6. Fechar bem os tubos de centrífuga e agitar com a mão ou em agitador mecânico até formar uma mistura bem homogênea. Deixar o tubo em repouso, a temperatura ambiente, por 15 minutos, para que ocorra a mucólise ou fluidificação da amostra.

7. Abrir os tubos com a amostra e acrescentar Água destilada estéril até o volume de 10 ml. Fechar bem os tubos de centrifuga e agitar em agitador mecânico até formar uma mistura bem homogênea.

Realizar os procedimentos de 8 a 10 fora da CSB

8. Centrifugar a 3.000 x g por 15 minutos.
9. Após a parada total da centrifuga, esperar 5 minutos para abrir.
10. Retirar as caçapas fechadas da centrifuga e colocar na CSB.

Realizar os procedimentos de 11 a 19 dentro da CSB

11. Abrir as caçapas e acondicionar os tubos da centrifuga em uma estante. Desprezar o sobrenadante de cada tubo de centrifuga em um recipiente a prova de respingos.
12. Adicionar com uma pipeta Pasteur 3 gotas de Água destilada estéril sobre o sedimento.
13. Fechar o tubo e agitar em agitador mecânico para ressuspender o sedimento.
14. Com uma pipeta Pasteur estéril depositar duas gotas do sedimento na lâmina e, com a ponta da pipeta, preparar um esfregaço da baciloscopia concentrada de 1 x 2 cm, no centro da lâmina.
Obs.: Não aquecer a lâmina durante a preparação do esfregaço. Esse procedimento é uma fonte importante de formação de aerossóis no ambiente laboratorial e, além disso, produz precipitados granulosos que prejudicam a coloração e a detecção do bacilo¹.
15. Colocar a lâmina com o esfregaço voltado para cima, sobre a bancada da CSB forrada com papel para secar.
16. Repetir os passos anteriores, até processar todos os esfregaços.
17. Deixar secar completamente todos os esfregaços, a temperatura ambiente.
18. Colocar todas as lâminas lado a lado, com esfregaço voltado para cima, em uma bandeja de metal forrada com papel absorvente e transportar até a bancada onde as mesmas serão fixadas em bico de Bunsen conforme descrito no item 6.3 deste capítulo.

ATENÇÃO: Fixar o esfregaço, somente quando as lâminas estiverem completamente secas.

19. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.

6.3 Fixação do esfregaço

Precauções

Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança, tais como as boas práticas de laboratório e o uso de EPI adequados conforme descrito no Capítulo 3.

Materiais

Equipamentos

- Bico de Bunsen.

Reagentes

- Solução de Álcool a 70%
- Solução de Fenol a 5%.

A fórmula e o preparo da Solução de Álcool a 70% e da Solução de Fenol a 5% estão descritos nos anexos do capítulo 3.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Pinça anatômica com pelo menos 12 cm, ponta arredondada e internamente serrilhada.
- Recipiente com tampa contendo pedaços de gaze estéril.
- Caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

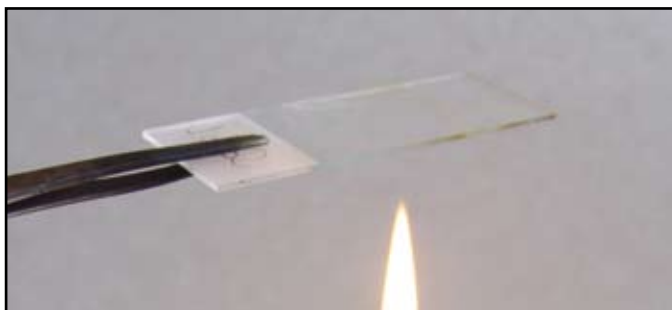
Procedimentos de organização

1. Forrar a bancada com papel-toalha ou outro que tenha capacidade de absorver respingos.
2. Providenciar e organizar, na bancada, os materiais necessários para fixar o esfregaço.

Procedimentos de realização

1. Retirar da bandeja de metal cada lâmina de uma vez, com a pinça anatômica, com o esfregaço voltado para cima e passar **rapidamente, por três vezes**, sobre a chama do bico de Bunsen conforme Figura 3.

Figura 3 Fixação do esfregaço



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

2. Devolver a lâmina, com esfregaço fixado, para a bandeja de metal.
3. Repetir os procedimentos 1 e 2 até fixar todos os esfregaços.
4. Transportar a bandeja de metal para a bancada onde as lâminas serão coradas.
5. Descartar o papel que está forrando a bancada de trabalho e fazer a descontaminação conforme descrito no Capítulo 3.

Depois de fixados, os esfregaços ficam aderidos às lâminas e estão prontos para a coloração.

6.4 Métodos de coloração

A parede celular das micobactérias, responsável pela morfologia bacilar, tem em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos. A ligação de alguns desses lipídios com o corante Fucsina gera complexos que são responsáveis pela característica tintorial de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas, apresentada pelas células bacterianas que são então designadas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR)¹.

O método original de coloração usou “Fucsina Saturada” (Ehrlich) ou uma solução de Fucsina contendo 0,75% de Fucsina Básica (Neelsen). Em um curto espaço de tempo Neelsen fez uma comunicação oral do método estabelecido: uma solução com Fucsina a 1% aquecida até a emissão de vapores, descorado com ácido sulfúrico a 25% e uma coloração de fundo com Azul de Metileno. Ao longo do tempo, muitas variações têm sido desenvolvidas a partir desse método básico sendo a mais utilizada a que usa uma solução de Fucsina a 0,3%. O método de coloração a frio, usando um corante de Fucsina Saturada (3%), é várias vezes referenciado como o método de coloração de Kinyoun, embora a descrição original incluísse uma etapa de digestão com hipoclorito. A modificação de Gabbett combinou as soluções de descoloração e coloração de fundo, reduzindo o procedimento para duas etapas o que resultou em

diminuição na carga de trabalho, isso fez com que esse método se tornasse popular especialmente nos países com mão-de-obra de alto custo. O método de coloração de Tan Thiam Hok combinou a coloração primária a frio e saturada com a modificação de Gabbett e foi também amplamente adaptada⁵.

Em um metódico estudo comparativo de vários métodos de coloração com diferentes concentrações de Fucsina, o método de coloração usando Fucsina a 1% e aquecimento por 15 minutos produziu os mais consistentes resultados com a mais alta sensibilidade⁵. Quando a qualidade da Fucsina não é boa, sugerimos utilizá-la em uma concentração de 1%.

O microscópio comum tem sido substituído pelo microscópio de fluorescência nos países com baixa prevalência onde o custo com recursos humanos é maior do que com instrumentos, e onde o número de amostras clínicas paucibacilares é maior. O método de coloração que é utilizado para corar os esfregaços que são examinados pelo microscópio de fluorescência requer soluções de corantes diferentes. A Auramina O é sempre utilizada como corante primário, sozinha ou em combinação com a rodamina para melhor diferenciação. Muitas variações existem para a coloração de fundo do esfregaço na microscopia de fluorescência: permanganato de potássio é normalmente usado para fluorescência não específica, mas métodos sem coloração de fundo ou que usem acridina laranja, tiazina vermelha ou Azul de Metileno são padronizados em alguns países. Recentemente, a tinta nanquim azul diluída tem sido usada, produzindo um bom contraste sem que o fundo se apresente muito escuro, o que dificulta a manutenção do foco como ocorre com o permanganato algumas vezes⁵.

Neste manual estão descritos dois métodos de coloração, o método de Ziehl-Neelsen e o método da Fluorescência com Auramina O.

6.4.1 Método de Ziehl-Neelsen

Vários métodos de coloração têm sido desenvolvidos na microscopia para BAAR, mas nem todos podem ser usados em uma rede nacional de laboratórios. A padronização utilizando um único método em todo país é crucial. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) deve insistir na manutenção de um único método e na formulação apropriada de corantes para este método. O PNCT deve selecionar um método de coloração que utilize o microscópio comum e um método que utilize o microscópio de fluorescência que devem ser padronizados para toda a rede nacional de laboratórios. O primeiro método deve ser factível em todos os laboratórios que realizam baciloscopia. O segundo é indicado como triagem, para reduzir o tempo de leitura dos exames negativos e é indicado para laboratórios que realizam mais de 50 amostras de escarro por dia. O método de Ziehl Neelsen baseia-se na propriedade de álcool-ácido resistência e sua utilização é recomendada pelo Ministério da Saúde para todos os laboratórios que realizam o diagnóstico da TB pulmonar pelo Ministério da

Saúde, uma vez que possibilita a identificação de BAAR e utiliza o microscópio ótico comum, para leitura do esfregaço.

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança tais como as boas práticas de laboratório e o uso de EPI adequados conforme descrito no Capítulo 3.
- Seguir rigorosamente o que está descrito no Procedimento Operacional Padrão (POP).
- Realizar Controle de Qualidade Interno.

Materiais

Equipamentos

- Cronômetro.
- Bancada com cuba de inox e água corrente.

OBS.: Para coloração, pode ser utilizada uma cabine de exaustão de gases sobre a bancada com cuba de inox.

Reagentes

- Solução de Álcool a 70%.
- Álcool etílico comercial.
- Fucsina Fenicada a 0,3%.
- Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%.
- Azul de Metileno a 0,3%.

As fórmulas e o preparo dos corantes e da solução descorante estão descritas no item 6.9 deste Capítulo. A fórmula e o preparo Solução de Álcool a 70% e da Solução de Fenol a 5% estão descritos nos anexos do Capítulo 3.

Insumos

- Suporte para corar lâminas.
- 2 frascos de vidro de 200 ml, cor âmbar, tampa de vidro esmerilhada, tipo contagotas, para os corantes Fucsina Fenicada a 0,3% e Azul de Metileno a 0,3%.
- 1 frasco de vidro de 200 ml, com tampa de vidro esmerilhada, tipo contagotas para a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%.
- Pinça anatômica com pelo menos 12 cm, ponta arredondada e internamente serrilhada.
- Haste de metal com proteção contra aquecimento em uma das extremidades (para suporte do algodão no aquecimento da Fucsina).

- Estante para tubos de 16 mm x 150 mm para secar as lâminas.
- Algodão hidrófilo.
- Funil de vidro haste curta de 50 a 80 mm de diâmetro para filtrar corantes.
- Papel de filtro de 15 cm e diâmetro.
- Caixa de fósforos.
- Caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.

Procedimentos de organização:

1. Providenciar e organizar na bancada com cuba de inox os materiais necessários para corar o esfregaço.
2. Organizar tudo de forma a assegurar um fluxo de trabalho lógico e seguro.

Procedimentos de realização

1. Colocar as lâminas (no máximo 12 de cada vez⁷) com o esfregaço voltado para cima, sem encostar umas nas outras e de acordo com o número de ordem de registro no suporte para corar.
2. Forrar um funil de vidro com papel de filtro e filtrar a Fucsina Fenicada a 0,3% para dentro do frasco conta-gotas. Filtrar apenas o volume suficiente para cobrir os esfregaços das lâminas que você vai corar.
3. Cobrir com a Fucsina filtrada, todo o esfregaço de cada uma das lâminas.

OBS.: É fundamental filtrar a Fucsina, na hora do uso, para retirar os cristais que se formam quando a mesma está em repouso.

4. Enrolar um chumaço de algodão na ponta de uma haste de metal com proteção contra aquecimento numa das extremidades.
5. Umedecer o algodão com álcool etílico. Cuidado para não escorrer álcool etílico na haste.
6. Colocar fogo no algodão umedecido com álcool etílico.
7. Passar a chama lentamente por debaixo das lâminas até que ocorra a emissão de vapores visíveis, conforme Figura 4. Retirar imediatamente a chama para evitar que a Fucsina ferva.

Figura 4 Aquecimento da Fucsina



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

Marcar o tempo de **5 minutos** assim que ocorrer a primeira emissão de vapores, e repita o **passo 7** mais duas vezes. Isso significa que, ao todo, deve-se passar **três vezes** a chama lentamente até a emissão de vapores e essa operação deve durar **5 minutos**, a contar da primeira emissão de vapores.

8. Inclinar cada uma das lâminas e derramar a Fucsina na pia.
9. Abrir devagar a torneira até obter um filete de água corrente para lavar as lâminas.
10. Deixar o filete de água cair em cima do número de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar todo o corante, conforme Figura 5.

Figura 5 Lavagem da Fucsina em Água Corrente



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

11. Lavar também o lado oposto ao esfregaço de cada lâmina para eliminar a Fucsina ali depositada, se necessário passar uma gaze para retirar a fuligem do fogo, aderida no lado de baixo da lâmina.
12. Colocar cada lâmina novamente no suporte com o esfregaço voltado para cima.
13. Repetir os itens de 10 a 12 para todas as lâminas que estão com fucsina.

Descoloração do esfregaço pelo Método de Ziehl-Neelsen

1. Cobrir completamente cada lâmina com a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%, e esperar 1 minuto.
2. Segurar cada lâmina pela borda numerada, **inclin**ar e **derramar** a solução descorante na pia.
3. Deixar o filete de água corrente cair em cima do número de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço e eliminar o Álcool-Ácido.
4. Verificar se os esfregaços ficaram descorados. Considera-se **descorado** o **esfregaço** que apresentar **coloração esbranquiçada** ou **levemente rosada**.

OBS.: Os procedimentos de 1 a 3 não devem ultrapassar 3 minutos, considerando os esfregaços de todas as lâminas que estão sendo descoradas.

5. Repetir os itens de 2 a 4 para todas as lâminas que estão com a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%.

Coloração de fundo pelo Método de Ziehl-Neelsen

1. Forrar um funil de vidro com papel de filtro e filtrar o Azul de Metileno a 0,3% num frasco conta-gotas. **Filtrar** apenas o volume suficiente para cobrir o esfregaço das lâminas que vão ser coradas.
2. Cobrir o esfregaço de cada uma das lâminas com o Azul de Metileno já filtrado. **Esperar** 30 segundos.
3. Segurar, com uma pinça anatômica e pela borda numerada, e inclinar cada lâmina para **derramar** o Azul de Metileno na pia.
4. Deixar cair um **filete de água corrente** em cima do número da lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar todo o Azul de Metileno a 0,3%.
5. Girar cada lâmina e **lavar** também o lado oposto ao esfregaço para eliminar o Azul de Metileno a 0,3% depositado ali.
6. Colocar cada uma das lâminas em pé, para secar em uma estante de tubos, conforme Figura 6. Essa estante deve estar forrada com papel absorvente, de preferência papel de filtro, conforme Figura 6.

Figura 6 Estante para Secar as Lâminas



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

ATENÇÃO: A estante com as lâminas deve ficar ao abrigo da luz solar. Quando as lâminas estiverem secas, proceder à leitura microscópica e a interpretação dos resultados conforme descrito no item 6.5 deste capítulo.

6.4.2 Método da fluorescência com Auramina O⁵

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança, tais como as boas práticas de laboratório e o uso de EPI adequados conforme descrito no Capítulo 3.
- Seguir rigorosamente o que está descrito no Procedimento Operacional Padrão (POP).
- Realizar Controle de Qualidade Interno.
- O esfregaço a ser corado por esse método deve ser mais delgado do que para o método de Ziehl Neelsen.

Materiais

Equipamentos

- Cronômetro.
- Bancada com cuba de inox e água corrente.

OBS.: Para coloração, pode ser utilizada uma cabine de exaustão de gases sobre a bancada com cuba de inox.

Reagentes

- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Auramina Fenicada.
- Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1%.
- Solução de Permanganato de Potássio ou de Tinta Nanquim Azul.

As fórmulas e o preparo dos corantes e da solução decolorante estão descritas no item 6.9 deste Capítulo. A fórmula e o preparo Solução de Álcool a 70% e da Solução de Fenol a 5% estão descritos nos anexos do Capítulo 3.

Insumos

- Suporte para corar lâminas.
- 2 frascos de vidro de 200 ml, cor âmbar, tampa de vidro esmerilhada, tipo conta-gotas, para a Solução de Auramina Fenicada, Solução de Permanganato de Potássio ou de Tinta Nanquim Azul.
- 1 frasco de vidro de 200 ml, com tampa de vidro esmerilhada, tipo conta-gotas para a Solução Descolorante de Álcool-Ácido a 1%.
- Pinça anatômica com pelo menos 12 cm, ponta arredondada e internamente serrilhada.
- Estante para tubos de 16 mm x 150 mm para secar as lâminas.
- Algodão hidrófilo.
- Caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.

Procedimentos de organização

1. Providenciar e organizar na bancada com cuba de inox os materiais necessários para corar o esfregaço.
2. Organizar tudo de forma a assegurar um fluxo de trabalho lógico e seguro.

Procedimentos de realização

1. Colocar as lâminas (no máximo 12 de cada vez⁷) com o esfregaço voltado para cima, sem encostar umas nas outras e de acordo com o número de ordem de registro no suporte para corar.
2. Cobrir com a Solução de Auramina Fenicada, todo o esfregaço de cada uma das lâminas.
3. Marcar o tempo de **20 minutos**.
4. Inclinar cada uma das lâminas e derramar a Solução de Auramina Fenicada na pia.
5. Colocar cada lâmina novamente no suporte com o esfregaço voltado para cima.
6. Repetir os itens de 4 a 5 para toda as lâminas que estão com a Solução de Auramina Fenicada.

Descoloração do esfregaço pelo Método da Fluorescência com Auramina O

1. Cobrir completamente cada lâmina com a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1%, e esperar 2 minutos.
2. Segurar cada lâmina pela borda numerada, inclinar e derramar a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1% na pia.
3. Deixar o filete de água corrente cair em cima do número de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço e eliminar a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1%.
4. Colocar cada lâmina novamente no suporte com o esfregaço voltado para cima.

Obs.: Os procedimentos de 1 a 2 não devem ultrapassar 3 minutos, considerando os esfregaços de todas as lâminas que estão sendo descoradas.

5. Repetir os itens de 2 a 4 para todas as lâminas que estão com a Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1%.

Coloração de fundo pelo Método da Fluorescência com Auramina O

1. Cobrir o esfregaço de cada uma das lâminas com a Solução de Permanganato de Potássio ou de Tinta Nanquim Azul. **Esperar** 1 minuto.
2. Segurar, com uma pinça anatômica e pela borda numerada, e inclinar cada lâmina para **derramar** a Solução de Permanganato de Potássio ou de Tinta Nanquim Azul na pia.
3. Deixar cair um **filete de água corrente** em cima do número da lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar todo a Solução de Permanganato de Potássio ou de Tinta Nanquim Azul.
4. Girar cada lâmina e **lavar** também o lado oposto ao esfregaço para eliminar a Solução de Permanganato de Potássio ou de Tinta Nanquim Azul depositado ali.
5. Colocar cada uma das lâminas em pé para secar em uma estante de tubos. Essa estante deve estar forrada com papel absorvente, de preferência papel de filtro.

ATENÇÃO: A estante com as lâminas deve ficar ao abrigo da luz solar. Quando as lâminas estiverem secas, proceder à leitura microscópica e a interpretação dos resultados conforme descrito no item 6.5 deste capítulo.

6.5 Leitura e interpretação dos resultados

A técnica a ser utilizada na leitura das baciloscopias deve ser selecionada em função do tipo de amostra clínica, método de execução do esfregaço e método de coloração. Na leitura de todas as baciloscopias devem ser lidos no mínimo 100 campos úteis de microscópico, ou seja, aqueles campos nos quais se observam elementos celulares de origem pulmonar (leucócitos, fibras mucosas e células ciliares). Os campos em que não aparecem esses elementos não devem ser contabilizados na leitura.

Para a baciloscopia realizada com escarro espontâneo distendido diretamente sobre a lâmina ou escarro após concentração, corado pelo método de Ziehl-Neelsen a leitura e interpretação dos resultados devem ser realizadas conforme padronização do Ministério da Saúde¹. No caso de baciloscopias a partir de outras amostras clínicas, após concentração ou não, o esfregaço deve ser oval e a leitura realizada em toda a extensão. Os esfregaços de escarro distendidos em 3/4 da lâmina, corados pelo Método da Fluorescência com Auramina O, a leitura deve ser realizada em toda a extensão, sem imersão, com a objetiva de 40x.

Os critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia realizada com escarro espontâneo distendido e corado pelo método de Ziehl-Neelsen estão descritos no Quadro 2¹.

Quadro 2 Critérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia de Escarro, após Concentração ou não, Corada pelo Método de Ziehl-Neelsen

QUANDO:
• não são encontrados BAAR em 100 campos = relata-se o resultado como NEGATIVO;
• são encontrados de 1 a 9 BAAR em 100 campos = relata-se apenas a quantidade de BAAR encontrada;
• são encontrados de 10 a 99 BAAR, em 100 campos = relata-se o resultado como POSITIVO +;
• é encontrada em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO ++;
• é encontrada em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO +++.

Adaptado de: Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Manual TELELAB. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília. 2001.

Os critérios para leitura e interpretação dos resultados da Baciloscopia de outras amostras clínicas após concentração ou não, estão descritos no Quadro 3¹:

Quadro 3 Critérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia a partir de outras amostras clínicas, após concentração ou não

QUANDO:
• não são encontrados BAAR no material examinado = relata-se o resultado como NEGATIVO ;
• são encontrados BAAR em qualquer quantidade , no material examinado = relata-se o resultado como POSITIVO .

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Manual TELELAB. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília. 2001.

6.5.1 Leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia direta do escarro espontâneo ou do escarro após concentração, corada pelo o método de Ziehl-Neelsen

Precauções

- Limpar a lente de imersão após a leitura de cada esfregaço positivo.
- Usar um microscópio que esteja em boas condições conforme descrito no Capítulo 11.
- Cuidar para o frasco conta-gotas não tocar no esfregaço, a ponta do conta-gotas pode carregar bacilos de uma lâmina positiva para uma lâmina negativa.
- Seguir a ordem crescente de numeração das lâminas para ler.
- Verificar sempre se os resultados positivos estão aparecendo de forma consecutiva, isso pode ser indício de que se está transferindo bacilos nos processos de preparação, coloração e leitura das baciloscopias.
- Realizar uma análise semanal e mensal dos resultados da baciloscopia para verificar a porcentagem de resultados positivos. Caso os resultados se diferenciem bruscamente do normal, realize uma investigação para determinar as causas.

Materiais

Equipamentos

- Microscópio binocular, condensador de campo claro, com lâmpada de halogênio, ocular 10x (campo amplo) e objetiva de 10x, 40x acromática e de imersão de 100x planacromática com mola.

Reagente

- Óleo de imersão.
- Solução de Álcool a 70%.

Insumos

- Caixa porta-lâmina, de plástico, com tampa, capacidade de 50 lâminas.

- Caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.
- Papel absorvente para limpar as lentes do microscópio.
- Etiqueta, fita crepe e fita adesiva.
- Gaze.
- Caneta esferográfica azul e vermelha.
- Lápis de grafite.
- Papel quadriculado para registro dos resultados, no item 6.9.1 deste capítulo apresentamos modelo de formulário de papel quadriculado.
- Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade.

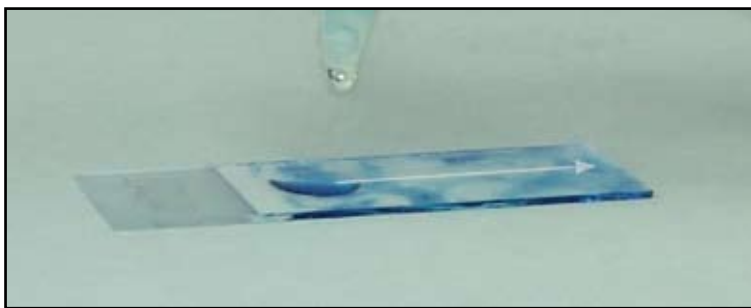
Procedimentos de organização

1. Providenciar e organizar a bancada com o microscópio de campo claro e os materiais necessários para realizar a leitura da baciloscopia.
2. Organizar tudo de forma a assegurar um fluxo de trabalho lógico e seguro.

Procedimentos de realização

- A leitura deve ser feita da esquerda para a direita conforme Figura 7.

Figura 7 Sentido de Leitura da Lâmina



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

1. Registrar, no formulário papel quadriculado de registro de leitura, o número da lâmina e se é para diagnóstico ou controle conforme Figura 8.

Figura 8 Formulário de Registro de Leitura

Laboratório:		Controle	
Diagnóstico			
Lâmina nº :			

Nº de Bacilos: _____

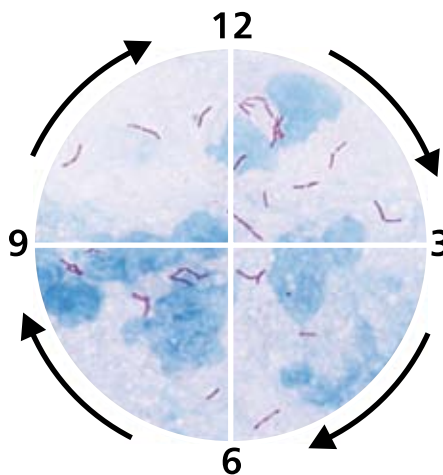
Nº de Campos: _____

Resultado/cruzes: _____

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. 2001

2. Pingar uma gota de óleo de imersão, próximo ao número e no centro da lâmina, sem tocar no esfregão com o conta-gotas para evitar transferir material de uma lâmina para outra.
3. Colocar a lâmina no *charriot* do microscópio.
4. Girar o canhão do microscópio até que a lente objetiva de 10x esteja sobre a lâmina, focar a imagem com os botões macro e micrômetro.
5. Ajustar a distância entre as lentes oculares de acordo com a distância entre seus olhos, de modo a enxergar apenas uma imagem.
6. Girar o botão para ajustar a altura do condensador e abrir o diafragma para obter uma boa luminosidade.
7. Trocar a objetiva de 10x pela objetiva de imersão (100x) imergindo-a no óleo.
8. Aproximar a objetiva de 100x lentamente para não quebrar a lâmina.
9. Ajustar o foco com o botão micrométrico até que a imagem fique nítida. Durante toda a leitura ajustar o foco apenas com esse botão.
10. Dividir mentalmente o campo microscópico, que está visualizando, em quatro quadrantes, utilizando os números 12, 3, 6 e 9, como no mostrador de um relógio conforme Figura 9.

Figura 9 Campo Microscópico



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

11. Iniciar a leitura pelo quadrante superior direito, entre os números 12 e 3. Utilizar o botão micrométrico para verificar a presença de BAAR na superfície e em profundidade. Contar os bacilos, se os mesmos forem visualizados.
12. Continuar a leitura dos outros quadrantes no sentido dos ponteiros do relógio. Contar os bacilos presentes em todos os quatro quadrantes e anotar no papel quadriculado o número total de bacilos que foram encontrados nesse campo.

OBS.: Para separar um campo microscópico do próximo, sem que fique sobreposto, usar como referência um elemento celular no número 3 do relógio. Qualquer elemento observado nesse ponto, uma célula, uma fibra, um bacilo, deverá ficar imediatamente anterior ao número 9 do campo seguinte.

13. Repetir os itens 11 e 12 até completar 20 campos, seguindo os mesmos procedimentos.
14. Somar os resultados dos 20 campos e calcular a média.
15. Analisar a média obtida para os resultados nos 20 primeiros campos observados, considerando as seguintes possibilidades.
 - i. Se a média for **de mais de 10 BAAR por campo**, encerrar a leitura. Essa amostra é **positiva +++**.
 - ii. Se a média for **inferior a 10 BAAR por campo ou não contiver BAAR**, continuar a leitura até completar 50 campos.

16. Fazer a leitura e anotar os resultados até completar 50 campos, seguindo os mesmos procedimentos.
17. Somar os resultados dos 50 campos e calcular a média.
18. Analisar a média obtida para os resultados dos 50 campos observados, considerando as seguintes possibilidades:
 - i. Se a média obtida for de **1 a 10 BAAR por campo**, encerrar a leitura. Essa amostra é **positiva ++**.
 - ii. Se a média obtida for inferior a 1 BAAR por campo ou não contiver BAAR, continuar a leitura até completar 100 campos.
19. Fazer a leitura e anotar os resultados até completar 100 campos, seguindo os mesmos procedimentos.
20. Somar e analisar os resultados dos 100 campos considerando as seguintes possibilidades:
 - i. Se for encontrado um total de **10 a 99 BAAR nos 100 campos** examinados, encerrar a leitura. Essa amostra é **positiva +**.
 - ii. Se for encontrado um total de **1 a 9 BAAR nos 100 campos** examinados, **relatar o número exato de BAAR encontrados**.
 - iii. Se **não forem encontrados BAAR, nos 100 campos observados**, essa amostra é **negativa**.
21. Repetir os procedimentos a partir do item 2, para cada uma das lâminas a serem lidas.
22. Após a leitura das lâminas, descartar os potes que foram guardados na geladeira depois de confeccionados os esfregaços, de acordo com o Capítulo 3.
23. Limpar o microscópio conforme descrito no Capítulo 11.

6.5.2 Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia de outras amostras clínicas, após concentração ou não

Precauções

- Apresentadas no item 6.5.1 deste capítulo.

Materiais

Equipamentos

- Microscópio binocular, condensador de campo claro, com lâmpada de halogênio, ocular 10x (campo amplo) e objetiva de 10x, 40x acromática e de imersão de 100x planacromática com mola.

Reagente

- Óleo de imersão.
- Solução de Álcool a 70%.

Insumos

- Caixa de papelão rígido para descarte de materiais contaminados.
- Papel absorvente para limpar as lentes do microscópio.
- Gaze.
- Caneta esferográfica azul e vermelha.
- Lápis de grafite.
- Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade, modelo de registro no Capítulo 1 deste manual.

Procedimentos de organização

1. Providenciar e organizar a bancada com o microscópio de campo claro e os materiais necessários para realizar a leitura da baciloscopia.
2. Organizar tudo de forma a assegurar um fluxo de trabalho lógico e seguro.

Procedimentos de realização

1. Pingar uma gota de óleo de imersão, sem tocar no esfregaço com o conta-gotas para evitar transferir material de uma lâmina para outra.
2. Colocar a lâmina no *charriot* do microscópio.
3. Girar o canhão do microscópio até que a lente objetiva de 10x esteja sobre a lâmina, focar a imagem com os botões macro e micrômetro.
4. Ajustar a distância entre as lentes oculares de acordo com a distância entre seus olhos, de modo a enxergar apenas uma imagem.
5. Girar o botão para ajustar a altura do condensador e abrir o diafragma para obter uma boa luminosidade.
6. Trocar a objetiva de 10x pela objetiva de imersão (100x) imergindo-a no óleo.
7. Aproximar a objetiva de 100x lentamente para não quebrar a lâmina.
8. Ajustar o foco com o botão micrométrico até que a imagem fique nítida. Durante toda a leitura ajustar o foco apenas com esse botão.
9. Dividir mentalmente o campo microscópico, que está visualizando, em quatro quadrantes, utilizando os números 12, 3, 6 e 9, como no mostrador de um relógio conforme Figura 8.
10. Iniciar a leitura pelo quadrante superior direito, entre os números 12 e 3. Utilizar o botão micrométrico para verificar a presença de BAAR na superfície e em profundidade.
11. Continuar a leitura dos outros quadrantes no sentido dos ponteiros do relógio.

OBS.: Para separar um campo microscópico do próximo, sem que fique sobreposto, usar como referência um elemento celular no número 3 do relógio. Qualquer elemento observado nesse ponto,

uma célula, uma fibra, um bacilo, deverá ficar imediatamente anterior ao número 9 do campo seguinte.

12. Repetir os itens 10 e 11 até encontrar **BAAR** ou até examinar todo o esfregaço.
13. Analisar os resultados considerando as seguintes possibilidades.
 - i. Se for encontrado **BAAR**, em quaisquer quantidades encerrar a leitura. Essa amostra é **positiva**.
 - ii Se **não forem encontrados BAAR, no material examinado**, essa amostra é **negativa**.
14. Repetir os procedimentos a partir do item 1, para cada uma das lâminas a serem lidas.
15. Após a leitura das lâminas, descartar os potes que foram guardados na geladeira depois de confeccionados os esfregaços, de acordo com o Capítulo 3.
16. Limpar o microscópio conforme descrito no Capítulo 11.

6.6 Registro dos resultados

Transcreva o resultado encontrado na leitura baciloscóptica para o formulário “Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia” correspondente, para Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade e para o sistema de informação GAL.

6.6.1 Registro dos Resultados da baciloscopia direta do escarro espontâneo ou do escarro após concentração, corada pelo o Método de Ziehl-Neelsen

- Transcrever os resultados dos papéis quadriculados para o formulário “Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia” dos pacientes e encaminhar para o local onde foi indicado aos mesmos. Modelo de formulário de “Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia” é apresentado no Capítulo 1.
- Registrar o resultado dos papéis quadriculados no sistema de informação GAL, Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade.
- Arquivar os papéis quadriculados com resultados, no mínimo por seis meses como referência para o Controle Externo da Qualidade (CEQ).

Procedimentos a serem realizados com as lâminas após leitura

- Limpar as lâminas depois de lidas pressionando levemente o esfregaço com papel absorvente, cuidando para não remover o esfregaço.
- Conservar por um período mínimo de seis meses, em temperatura ambiente, todas as lâminas examinadas, inclusive as lâminas coradas pelo Método da

Fluorescência com Auramina O, independentemente do resultado. As lâminas devem ser conservadas com a numeração original e em ordem numérica.

- Colocar em uma caixa porta lâminas, identificada com o símbolo de risco biológico, o mês, o nome do laboratório e do município. Se não houver a caixa especial, envolver as lâminas individualmente em papel suave. Depois fazer pacotes com 50 lâminas com papel de embrulho e identificar os pacotes da forma descrita, conforme descrito no Capítulo 2.
- Durante este período, o LACEN ou Laboratório de Referência Regional do Estado - LRRE (Laboratório Avaliador) poderá solicitar que as lâminas sejam enviadas juntamente com a cópia das folhas do Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade, que contém o número de ordem e os resultados das lâminas examinadas durante o período a ser controlado para o CEQ conforme descrito no Capítulo 2.

6.6.2 Registro dos Resultados da Baciloscopia de outras amostras clínicas, após concentração ou não

- Transcrever os resultados encontrados para o formulário “Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia” dos pacientes e encaminhar para o local onde foi indicado aos mesmos. O formulário “Solicitação e Resultado de Exame – Baciloscopia” é apresentado no Capítulo 1.
- Registrar o resultado encontrado para o sistema de informação GAL, Registro de Baciloscopia e/ou Registro de Cultura em Meio Sólido e Teste de Sensibilidade.
- Descartar as lâminas conforme descrito no Capítulo 3.

6.7 Controle de qualidade

O Controle de Qualidade Interno (CQI) e o Controle Externo da Qualidade (CEQ) da Baciloscopia estão descritos no Capítulo 2 – Sistema de Garantia da Qualidade da Baciloscopia.

6.8 Referências

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. *Manual TELELAB. 2001. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia*. Brasília. 2001.
2. WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part I. Organization and Management*. Geneva, Switzerland. WHO/TB/98.258. 1998.
3. WHO/World Health Organization. WHO Report 2007. *Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing*. WHO/HTM/TB/2007.376.2007
4. DAVID, H.L. *Bacteriology of mycobacterioses*. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Centre, Atlanta, USA, 1996.
5. RIEDER H.L.; VAN DEUN, A.; KAM, K.M.; KIM, S.J.; CHONDE, T.M.; TRÉBUCQ, A.; URBANCZIK, R. *Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries*. Second edition. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The IUATLD). Paris, France, 2007.
6. OPAS/Oficina Sanitaria Panamericano, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. *Guía para el Diagnóstico de la Tuberculosis por el Examen Microscópico*. Publicación Científica nº 277. Washington, EUA. 1973.
7. WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part II. Microscopy*. Geneva, Switzerland. WHO/TB/98.258.1998.

6.9 Anexos do capítulo

6.9.1 Formulário de papel quadriculado para registro dos resultados



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

**Formulário de Papel Quadriculado
para Registro dos Resultados**

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

6.9.2 Preparação de Reagentes

Os corantes e os reagentes devem ser preparados, obrigatoriamente, em capela de exaustão química e com EPI apropriados.

Nesse item, estão descritas as fórmulas e as informações para a preparação dos reagentes para a realização da Baciloscopia. Os formulários para o controle da preparação dos reagentes e corantes da Baciloscopia estão descritas no Capítulo 2.

6.9.2.1 Quadro 4 – Preparação da Fucsina Fenicada a 0,3%

Para obter 1 litro de Fucsina Fenicada a 0,3% é necessário que sejam preparadas, separadamente, uma solução de Fucsina Básica (solução A) e uma solução de fenol aquoso (solução B).

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO A – FUCSINA BÁSICA	
Álcool etílico 95% PA	100 ml
Fucsina Básica	3 g
1. Colocar a Fucsina em um balão de 1.000 ml. 2. Adicione aos poucos os 100 ml de álcool etílico no balão sobre a Fucsina. 3. Agitar o balão suavemente até a completa dissolução da Fucsina.	
Atenção: 3 gramas é a quantidade indicada na fórmula, desde que a Fucsina tenha no mínimo 88% de concentração de corante. Se a concentração for menor, é preciso calcular o fator de correção e depois multiplica-lo por 3 gramas, para encontrar a quantidade de Fucsina necessária à obtenção de um corante adequado. Fórmula do fator de correção = 1 dividido pelo equivalente decimal da concentração do corante = percentual de concentração do corante dividido por 100. Por exemplo: Fucsina em pó com concentração de corante = 75%. • Equivalente decimal = $75/100 = 0,75$ fator de correção = $1/0,75 = 1,33$. • Quantidade de Fucsina corrigida = $1,33 \times 3 \text{ g} = 3,99 \text{ g}$. Nesse exemplo, é preciso pesar 3,99 g de Fucsina para preparar a solução A.	
PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO B – FENOL AQUOSO	
Cristal de fenol	50 g
Água destilada qsp	1.000 ml
1. Colocar o fenol em um balão de 1.000 ml. 2. Adicionar 700 ml da Água destilada aos poucos no balão sobre o fenol. 3. Colocar o balão para aquecer em banho maria até o fenol dissolver completamente. 4. Retirar do banho maria e acrescentar Água destilada até completar 1.000 ml. 5. Deixar esfriar em temperatura ambiente.	
PREPARAÇÃO DA FUCSINA FENICADA A 0,3%	
1. Colocar 900 ml da solução B no balão contendo a solução A e agitar. 2. Tampar a boca do balão com papel alumínio e deixar repousar por 24 horas. 3. Filtrar, em funil com papel de filtro, diretamente em frasco âmbar de 1000 ml já rotulado com as seguintes informações: nome do corante, data da preparação, de validade, e a frase "Filtrar antes de usar". 4. Armazenar esse corante, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente.	

ATENÇÃO: Os 100 ml do fenol aquoso (Solução de Fenol a 5%) que sobraram podem ser utilizados como solução descontaminante.

6.9.2.2 Quadro 5 – Preparação da Solução Descorante de Álcool-Ácido a 3%

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DESCORANTE DE ÁLCOOL-ÁCIDO A 3%	
Álcool etílico comercial	970 ml
Ácido clorídrico concentrado	30 ml
1. Colocar os 970 ml de álcool-etílico comercial, em um balão de 1.000 ml. 2. Adicionar o ácido clorídrico, lentamente, deixando escorrer pelas paredes do balão que contém o álcool etílico. Atenção: sempre adicionar o ácido cuidadosamente sobre álcool etílico, pois esta mistura aquece. 3. Agitar o balão suavemente. 4. Colocar o álcool-ácido em um frasco de 1.000 ml rotulado com as seguintes informações: nome do decolorante, data da preparação, e de validade. 5. Armazenar essa solução em temperatura ambiente.	

6.9.2.3 Quadro 6 – Preparação de Azul de Metileno a 0,3%

PREPARAÇÃO DE AZUL DE METILENO A 0,3%	
Azul de Metileno	3 g
Água destilada qsp	1.000 ml
1. Colocar o azul de metileno em um balão volumétrico de 1.000 ml. 2. Adicionar a 100 ml da Água destilada ao Azul de Metileno. 3. Agitar o balão suavemente até a completa dissolução. 4. Adicionar o restante da água e agite bem. 5. Filtrar em papel de filtro diretamente em um frasco âmbar de 1000 ml já rotulado com as seguintes informações: nome do corante, data de preparação e validade, e a frase “Filtre antes de usar”. 6. Armazenar a solução de Azul de Metileno ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.	
Atenção: 3 gramas é a quantidade indicada na fórmula, desde que o Azul de Metileno tenha no mínimo 82% de concentração de corante. Se a concentração for menor, é preciso calcular o fator de correção e depois multiplicá-lo por 3 gramas, para encontrar a quantidade de Azul de Metileno necessária à obtenção de um corante adequado. Siga os mesmos procedimentos apresentados para a Fucsina no item 6.9.2.1 dos anexos	

6.9.2.4 Quadro 7 – Preparação da Auramina Fenicada

Para obter 1 litro de Auramina Fenicada é necessário que sejam preparadas, separadamente, uma Solução de Auramina (solução A) e uma solução de fenol aquoso (solução B).

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO A – AURAMINA	
Álcool etílico 95% PA	100 ml
Auramina O	1 g
1. Colocar a Auramina O em um balão de 100 ml. 2. Adicionar aos poucos 70 ml do álcool etílico no balão sobre a Auramina. 3. Agitar o balão suavemente até a completa dissolução. 4. Completar o volume de 100 ml com o álcool etílico.	

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO B – FENOL AQUOSO	
Fenol líquido	30 ml
Água destilada qsp	870 ml
Fenol líquido é usualmente preparado como solução estoque pela dissolução de 9 partes (peso) de cristais de fenol em 1 parte (peso ou volume) de água pelo aquecimento. Esta solução quente ficará líquida a temperatura ambiente (o ponto de fusão do fenol é 43°C, fenol com 6% de água fundirá a 20°C). 1. Colocar o fenol em um balão de fundo chato de 1.000 ml. 2. Adicionar lentamente 870 ml da Água destilada no balão sobre o fenol.	

PREPARAÇÃO DA AURAMINA FENICADA	
1. Misturar todo o volume da solução A na solução B. 2. Colocar a Solução da Auramina Fenicada em um frasco âmbar, bem vedado já rotulado com as seguintes informações: nome do corante, data da preparação e de validade. 3. Armazenar esse corante, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Esse corante pode ser utilizado até 3 meses após a preparação.	

6.9.2.5 Quadro 8 – Preparação da Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1%

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DESCORANTE DE ÁLCOOL-ÁCIDO A 1%	
Álcool etílico comercial	990 ml
Ácido clorídrico concentrado	10 ml
1. Colocar os 990 ml de álcool-etílico comercial, em um balão de 1.000 ml. 2. Adicionar o ácido clorídrico, lentamente, deixando escorrer pelas paredes do balão que contém o álcool etílico. Atenção: sempre adicionar o ácido cuidadosamente sobre álcool etílico, pois esta mistura aquece. 3. Agitar o balão suavemente. 4. Colocar o Solução Descorante de Álcool-Ácido a 1% em um frasco de 1.000 ml rotulado com as seguintes informações: nome do decolorante, data da preparação, e de validade. 5. Armazenar essa solução em temperatura ambiente.	

6.9.2.6 Quadro 9 – Preparação da Solução de Permanganato de Potássio

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PERMANGANATO DE POTÁSSIO	
Permanganato de Potássio	0,5 g
Água destilada	100 ml
1. Colocar o Permanganato de Potássio em um balão volumétrico de 100 ml. 2. Adicionar a Água destilada ao Permanganato de Potássio. 3. Agitar o balão suavemente até a completa dissolução 4. Colocar em um frasco âmbar de 100 ml já rotulado com as seguintes informações: nome do corante, data de preparação e validade. 5. Armazenar a solução de Permanganato de Potássio ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.	

6.9.2.7 Quadro 10 – Preparação da Solução de Tinta de Nanquim Azul

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TINTA NANQUIM AZUL	
Tinta Nanquim Azul	0,5 g
Água destilada	100 ml
1. Colocar a Tinta Nanquim Azul em um balão volumétrico de 100 ml. 2. Adicionar a Água destilada a Tinta Nanquim Azul. 3. Agitar o balão suavemente até a completa dissolução 4. Colocar em um frasco âmbar de 100 ml já rotulado com as seguintes informações: nome do corante, data de preparação e validade. 5. Armazenar a solução de a Tinta Nanquim Azul ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.	

CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS

7.1 Descrição

Cultura é o exame laboratorial que permite a multiplicação e o isolamento de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) a partir da semeadura da amostra clínica, em meios de cultura específicos para micobactérias. É um método sensível e específico para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, principalmente para a tuberculose (TB) pulmonar e extrapulmonar.

O limite de detecção de bacilos da cultura é de 100 bacilos por mililitro de escarro, mas quando realizada com alta qualidade técnica é capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mililitros de escarro^{1,2}. É o método de referência (padrão-ouro) para avaliar um novo método diagnóstico.

Quando realizada no escarro, pode, em geral, adicionar 20% de casos ao total daqueles de TB pulmonar, não confirmados pela baciloscopia. Permite também a posterior identificação da espécie de micobactéria isolada e o teste de sensibilidade às drogas antituberculose, assim como a realização de várias técnicas moleculares. A especificidade da cultura para o diagnóstico da TB é maior do que 99%, sendo que a especificidade absoluta é conseguida quando são feitos os testes de identificação para o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB)³.

7.2 Critérios para realização da cultura

A cultura produz resultados tardiamente, porém é mais sensível que a baciloscopia. De modo geral, sua realização visa melhorar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial em três pontos básicos:

Diagnóstico de:

- Sintomáticos respiratórios com suspeita de TB devido à presença de sintomas clínicos compatíveis, exame de radiologia sugestivo e baciloscopia repetidamente negativa (mais de 3 amostras negativas).
- Casos suspeitos de TB com amostras paucibacilares (poucos bacilos) e/ou dificuldades de coleta da amostra (crianças, populações indígenas) e os casos suspeitos de TB extrapulmonar.
- Contatos de casos afetados por tuberculose resistente às drogas.
- Pacientes com antecedentes de tratamento prévio.
- Todos os pacientes imunodeprimidos, principalmente portadores de HIV, mesmo com baciloscopia positiva, visando a identificação da espécie e a realização do teste de sensibilidade.
- Casos suspeitos de infecções causadas por Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT) para realizar a identificação da espécie.

Controle de:

- Todo paciente com baciloscopia positiva ao finalizar o 2º mês de tratamento.
- Todos os pacientes com indicação de retratamento: após falência ao esquema I (E-I) de tratamento com rifampicina, isoniazida e pirazinamida (RHZ), tuberculose multirresistente (TBMR), recidiva da doença ou reinício de tratamento após abandono.

Vigilância de resistência às drogas:

- estudos epidemiológicos como atividades de vigilância, para determinar a prevalência da resistência primária (inicial) ou adquirida.

Esses são os critérios divulgados no II Consenso Brasileiro de Tuberculose, em 2004, e do Guia de Vigilância Epidemiológica – Tuberculose^{4,5}. Cada estado da Federação pode acrescentar detalhes ao seus Programas Estaduais de Controle da Tuberculose, visando intervir em determinadas situações por eles definidas como importantes. É o caso do Estado de São Paulo que, em 2002, publicou documento recomendando a realização de cultura para toda a população considerada de maior risco (moradores de rua, detentos, profissionais da saúde)⁶.

7.3 Métodos de cultura

Desde a década de 50, os métodos clássicos de cultura utilizados no laboratório são manuais. Utilizam meios de cultura sólidos e incubação em estufas bacteriológicas convencionais. A leitura das colônias de micobactérias é feita a olho nu e, em vista disso, o tempo de detecção de positividade da cultura varia de 14 a 28 dias até 8 semanas.

As formas disseminadas e rapidamente progressivas de tuberculose e de outras micobacterioses, encontradas com frequência em pacientes com Aids, exigiram um diagnóstico mais rápido. A partir de 1980, os métodos de cultura tiveram avanços tecnológicos com o desenvolvimento dos sistemas comerciais. Esses sistemas utilizam um método de processamento e semeadura de amostras muito similar aos métodos clássicos, de maneira que não diminui o trabalho prévio. Assim o que acelera é a leitura, pois a incubação é monitorada por sistema informatizado que acusa quando há crescimento celular e, portanto, o tempo de detecção da positividade é menor que o exigido para os clássicos.

A cultura em meio líquido utilizando sistemas automatizados não radiométricos e com monitoração contínua são os recomendados para laboratórios que recebem um grande volume de amostras clínicas, como hospitais e Laboratórios de Referência.

A opção do laboratório pela utilização de um sistema comercial automatizado de cultura deve levar em consideração vários aspectos como:

- Orçamento regular e contínuo para cobrir as prioridades da cultura.
- Eficiência com que se comercializam os insumos necessários.
- Treinamento dos técnicos no equipamento.
- Rapidez com que se processam as amostras após a coleta.
- Assistência técnica.
- Custo/complexidade/risco biológico.

7.4 Etapas da cultura

O exame de cultura abrange 5 etapas: (1) pré-tratamento das amostras clínicas – prepara as amostras, de acordo com suas características, para as demais etapas metodológicas; (2) fluidificação-descontaminação – utiliza agentes químicos para homogeneizar a amostra clínica e eliminar outros microrganismos da mesma; (3) semeadura em meio de cultura – proporciona o contato das micobactérias existentes na amostra com as substâncias nutritivas; (4) incubação – fornece a temperatura correta e constante, necessária para a multiplicação das micobactérias; e (5) leitura dos tubos semeados e registro dos resultados – verifica a presença de colônias ou de turvação e/ou de contaminação, como sinal de presença de micobactérias e registra a ocorrência.

7.5 Pré-tratamento das amostras

Essa etapa inclui o preparo das amostras clínicas quanto à necessidade de centrifugação e/ou maceração, de acordo com as suas características. No Quadro 1, estão descritos esses procedimentos para os diferentes tipos de amostras.

As amostras consideradas contaminadas são aquelas provenientes de sítios não estéreis, tais como escarro, urina, secreções, lavado brônquico, lavado gástrico e fragmento de tecido cutâneo.

As amostras consideradas não contaminadas são aquelas provenientes de sítios estéreis, tais como LCR, líquidos (pleural, sinovial, peritonal, pericárdico), fragmentos de órgãos, sangue e medula óssea. Para estas, não é necessário descontaminar. No entanto, para garantir que a cultura não seja perdida por contaminação, caso as amostras não tenham sido acondicionadas em condições estéreis, é recomendável, após os procedimentos de pré-tratamento, semear metade da amostra diretamente nos meios de cultura e descontaminar a outra metade conforme o método escolhido. As condições de coleta e armazenamento de amostras clínicas estão descritos no Capítulo 5.

Quadro 1 Procedimentos de pré-tratamento de amostras clínicas para cultura de micobactérias

Amostras clínicas	Procedimento de pré-tratamento
Escarro espontâneo	Não necessitam de pré-tratamento.
Escarro induzido; lavado brônquico; lavado bronco-alveolar (LBA); aspirado transtraqueal; lavado gástrico	Transferir a amostra para tubos de centrífuga e centrifugar durante 15 minutos a 3.000 x g. Desprezar o sobrenadante e proceder à cultura conforme o método escolhido.
Urina	Executar o mais rapidamente possível. Amostras com mais de 50 ml de volume devem ser distribuídas em vários tubos de centrífuga e centrifugado por 15 minutos a 3000 x g. Desprezar os sobrenadantes, juntar os sedimentos num único tubo de centrífuga e proceder à cultura conforme o método escolhido.
Líquidos: pleural, sinovial, peritoneal, pericárdico, ascítico e líquido cefalorraquidiano (LCR)	Transferir a amostra para tubos de centrífuga e centrifugar por 15 minutos a 3.000 x g. Quando coletadas assepticamente, semear diretamente nos meios de cultura escolhidos. Entretanto, caso seja desconhecida a qualidade da coleta, é recomendável semear metade da amostra diretamente nos meios de cultura e descontaminar a outra metade conforme o método escolhido.
Fragmentos de órgãos	Quando proveniente de órgãos sem microbiota associada macerar em gral com pistilo, estéreis, ou em tubos contendo pérolas de vidro estéreis, com um pouco de água ou salina estéreis, até a formação de uma suspensão homogênea. Dividir a suspensão obtida, e semear metade diretamente nos meios de cultura, e a outra metade descontaminar conforme o método escolhido.
Fragmentos cutâneos e de ossos	Macerar em gral com pistilo estéril, com um pouco de água ou salina estéreis, até a formação de uma suspensão homogênea. Misturar bem e proceder à descontaminação conforme o método escolhido.
Sangue e aspirado de medula	Não necessitam de descontaminação. Inocular diretamente nos meios de cultura, no momento da coleta, preferencialmente em sistemas semi-automatizados e automatizados de diagnóstico. Quando não disponíveis, inocular 5 ml diretamente no frasco de meio de cultura líquido ou bifásico. Para aspirado de medula na ausência de meio líquido semear 0,2 ml em dois tubos de meio sólido a base de ovo ou agar.
Aspirados de gânglios e de tumores (cavidades fechadas)	Quando coletados assepticamente não descontaminar, podendo todo o volume ser inoculado diretamente nos meios de cultura escolhidos. Entretanto, caso seja desconhecida a qualidade da coleta, é recomendável semear metade da amostra diretamente nos meios de cultura e descontaminar a outra metade conforme o método escolhido.
Pus e secreções (cavidades abertas)	Atritar o <i>swab</i> , imerso em Água destilada ou solução salina estéreis, contra a parede do tubo para liberar a amostra clínica nele contida. Descartar o <i>swab</i> e descontaminar a suspensão obtida conforme o método escolhido. Caso o <i>swab</i> não tenha sido encaminhado imerso em Água destilada ou solução salina estéreis, acrescentar um dos referidos líquidos ao mesmo e proceder como descrito anteriormente.

7.6 Agentes fluidificantes-descontaminantes

Os agentes químicos (ácidos, bases) liberam as micobactérias do muco e da fibrina (fluidificando o escarro) ou dos tecidos em que estão incluídos, homogeneizando a amostra clínica e eliminando outros microrganismos da mesma (Quadro 2). A eliminação destes proporciona o crescimento das micobactérias sem a competição pelos nutrientes contidos nos meios de cultura. Portanto, essa etapa é realizada apenas nas amostras contaminadas por microbiota associada ou ambiental.

A escolha do agente fluidificante-descontaminante e do meio de cultura está relacionada com o tipo de amostra clínica a ser processada. Para as amostras de escarro, a concentração do Hidróxido de sódio pode estar em concentrações de até 4%, e para as outras amostras pulmonares e extrapulmonares a concentração não deve ser superior a 2%.

Quadro 2 Agentes fluidificantes-descontaminantes usados no tratamento de amostras clínicas para cultura de micobactérias

AGENTES FLUIDIFICANTES-DESCONTAMINANTES	ATIVIDADE
Hidróxido de sódio (NaOH)	É o mais amplamente empregado, tem propriedades tanto fluidificantes como descontaminantes. Por se tratar de uma substância alcalina drástica, a concentração de uso é crítica e deve ser cuidadosamente observada, assim como o tempo em que fica em contato com a amostra. Nos métodos em que é utilizada sozinha, sua concentração é de 4%, sendo considerada alta.
N-acetil-L-cisteína (NALC)	É um agente mucolítico utilizado em combinação com o NaOH. Como não tem efeito direto sobre as micobactérias, permite que seja usada uma concentração de NaOH de 2%. Dessa maneira, a combinação NALC-NaOH é a indicada para amostras paucibacilares e a recomendada para a maioria dos sistemas comerciais de cultura com meios líquidos.
Ácido oxálico	É um agente descontaminante para amostras de escarro, contaminadas sucessivamente por <i>Pseudomonas</i> sp, principalmente quando provenientes de pacientes com fibrose cística. Utilizado na concentração de 5%.

A preparação dos reagentes utilizados nos métodos de cultura e os respectivos formulários para o controle da preparação estão descritas no item 7.17 dos anexos deste capítulo.

7.7 Meios de cultura

As micobactérias são exigentes para sua multiplicação em meios de cultura e requerem meios específicos. Os meios de cultura podem ser de consistência sólida à base de ovos ou de agar e de consistência líquida (Quadro 3).

Os meios líquidos são mais enriquecidos que os sólidos e por isso são indicados para amostras paucibacilares, como sangue, LCR e macerados de tecidos. Também são utilizados para subcultivos e armazenamento de cepas em freezer. Os sistemas

comerciais de cultura utilizam meios líquidos especiais, desenvolvidos a partir do Middlebrook 7H9.

Quadro 3 Meios de cultura utilizados no isolamento de micobactérias

MEIOS DE CULTURA		UTILIZAÇÃO
Sólidos	À base de ovos	Os mais utilizados Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh (OK), são preparados em tubos ou frascos e podem ficar por até 8 semanas em refrigeração. Todos contêm o corante verde de malaquita 2%, para inibir a microbiota contaminante. Esses meios permitem a incorporação de substâncias como ácido p-nitrobenzóico (PNB) a 500 µg/ml que pode ser utilizada na semeadura primária da amostra para agilizar uma identificação prévia da espécie de micobactéria. Os meios Löwenstein-Jensen com adição de PNB (LJ-PNB) ou Ogawa-Kudoh com adição de PNB (OK-PNB) são utilizados para diferenciar o CMTB das demais micobactérias. Para isolar <i>M. bovis</i> e <i>M. africanum</i> e <i>M. microti</i> substituir o glicerol pelo piruvato de sódio (0,5%) no meio de LJ (LJ-piruvato) ou OK (OK-piruvato). Para pesquisa de <i>M. haemophilum</i> , isolado de lesões de pele, adicionar citrato férrico amoniacal (2,5%) ao meio LJ ou OK. A preparação de meios de cultura utilizados nos métodos clássicos e os formulários para o controle de qualidade estão descritas no item 7.17 dos anexos deste Capítulo.
	À base de agar	São meios transparentes, o que permite a visualização precoce das colônias em lupas ou microscópio. Os meios Middlebrook à base de agar (Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11) devem ser enriquecidos com o suplemento Middlebrook OADC, composto por ácido oleico, albumina bovina (fração V), dextrose e catalase.
Líquidos	Middlebrook 7H9	É o meio líquido que necessita do enriquecimento ADC (albumina, dextrose e catalase).
	Middlebrook 7H9 modificado	O sistema comercial BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube (Becton & Dickinson), de leitura tanto manual como automatizada consiste em um meio líquido (Middlebrook 7H9), acrescido de antibióticos e enriquecimento OADC, acondicionado em um tubo contendo um sensor fluorescente sensível ao oxigênio, composto de rutênio pentahidratado em uma base de silicone.
		O sistema MB BacT Culture System BacT/ALERT® MP (BioMérieux) utiliza meio líquido Middlebrook 7H9 modificado, enriquecido com fatores de crescimento e solução antibiótica.
		O sistema ESP® Culture System II (AccuMed/Difco) utiliza um tubo contendo o meio líquido Middlebrook 7H9, com suplementos de antibióticos e enriquecimento OADC.
		O sistema BACTEC série 9000 utiliza o meio líquido Middlebrook 7H9 modificado (MycroF Lytic) para isolar micobactérias de amostras de sangue e medula óssea.
Bifásicos	O sistema Septi-Check utiliza um meio bifásico, cuja fase líquida é o meio Middlebrook 7H9 e a fase sólida é composta por 3 meios sólidos (LJ modificado, Middlebrook 7H11 e agar chocolate).	

7.8 Incubação

Após a realização das etapas de pré-tratamento, fluidificação-descontaminação e semeadura nos meios de cultura indicados, estes são colocados em temperaturas apropriadas e constantes, para o tempo de incubação necessário ao desenvolvimento de micobactérias.

A maioria das micobactérias, como as do CMTB, necessita de temperaturas entre 35°C e 37°C para multiplicação. Outras micobactérias como *M. marinum*, *M. ulcerans* e *M. haemophilus* somente se multiplicam em temperaturas que variam de 25°C a 30°C e *M. avium* ou *M. xenopi* exibem um ótimo crescimento entre 40°C e 42°C.

7.9 Leitura, interpretação e registro dos resultados

Essa etapa da cultura verifica a presença de crescimento de micobactéria e/ou de contaminação nos meios de cultura.

Registrar o resultado com todas as observações referentes a cada cultura como: data da leitura, número de colônias visualizadas, características morfológicas da colônia em relação à presença de pigmento e aspecto (lisa ou rugosa), e contaminação parcial ou total de cada tubo.

7.10 Métodos clássicos de cultura

No Quadro 4, estão listados os métodos clássicos ou convencionais de cultura que apresentam comprovadamente melhores taxas de isolamento de micobactérias e menores índices de contaminação.

Quadro 4 Métodos clássicos ou convencionais para cultura de micobactérias e suas indicações, agentes químicos e meios de cultura utilizados

MÉTODOS	INDICAÇÃO	FLUIDIFICANTE- DESCONTAMINANTE	MEIO DE CULTURA		
			SÓLIDOS A BASE DE		LÍQUIDOS
			OVO	AGAR	
Petroff modificado	Principalmente para as amostras de escarro espontâneo	Hidróxido de sódio (NaOH) 4%	Lowenstein-Jensen (LJ)	Middlebrook 7H10	Middlebrook 7H9
N-acetil-L-cisteína (NALC)	Para todas as amostras clínicas, principalmente as amostras paucibacilares	N-acetil-L-cisteína com Hidróxido de sódio (NALC-NaOH) 2%	Lowenstein-Jensen (LJ)	Middlebrook 7H10	Middlebrook 7H9
Ogawa-Kudoh	Para amostras de escarro espontâneo	Hidróxido de sódio (NaOH) 4%	Ogawa-Kudoh (OK)	-	-
Ácido Oxálico	Para amostras pulmonares que contém <i>Pseudomonas</i> sp (pacientes com fibrose cística)	Ácido Oxálico 5%	Lowenstein-Jensen (LJ)	-	-

A seguir serão descritos para cada um dos quatro métodos de cultura, a indicação, as precauções, os materiais (equipamentos, reagentes, insumos) e os procedimentos de organização e de realização (detalhes passo a passo da técnica) até a semeadura em meio de cultura. As fórmulas para o preparo dos reagentes de fluidificação-descontaminação e dos meios de cultura estão descritas no item Anexos deste capítulo e da Solução de Álcool a 70% está descrita no Capítulo 3.

As recomendações de incubação e leitura dos tubos semeados, comuns a todos os três métodos, serão descritas no item 7.11 deste capítulo.

O método do Ácido oxálico não é utilizado na rotina diária dos laboratórios, mas é importante para casos especiais, como é o caso de escarros que contém *Pseudomonas* sp, como por exemplo, o escarro de pacientes com fibrose cística e para urina e outros fluidos orgânicos persistentemente contaminados quando descontaminados por métodos de descontaminação alcalina, respectivamente.

7.10.1 Método de Petroff modificado

Descrição:

Esse método utiliza Solução de NaOH a 4% como agente de fluidificação-descontaminação, igual volume do escarro, chegando a uma concentração final de NaOH 2%. É indicado principalmente para amostras de escarro. Necessita de centrifugação e de neutralização.

A neutralização pode ser realizada com a adição: (a) de ácido e indicador de pH (normalmente o Vermelho de fenol); (b) Solução de Tampão Fosfato pH 6,8 ou (c) de Água destilada estéril^{1,7,8,9,10,11}.

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3. Abrir um pote de cada vez, com cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Observar a capacidade da centrífuga para estabelecer o número de tubos a serem trabalhados a cada lote. A centrífuga deve ser preferencialmente refrigerada para evitar que o aquecimento interfira na viabilidade da micobactéria. As caçapas devem ter proteção individual para evitar contaminação pela produção de aerossóis durante a centrifugação e devem ser abertas dentro da CSB.
- Como a concentração de NaOH 4% pode ocasionar também a eliminação de BAAR e, no caso de amostras paucibacilares, levar a resultados falsamente negativos, seguir rigorosamente as indicações de respeitar o tempo (menor ou igual a 15 minutos) em que a amostras ficam em contato com o agente descontaminante.

A preparação dos reagentes utilizados neste método está descrita no Anexo 7.17.2 deste Capítulo.

Materiais

Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica (CSB).
- Centrífuga com rotor para tubos de 30 ml ou de 50 ml.
- Agitador mecânico.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e outra a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pipetador automático ou manual.
- Cronômetro.

Reagentes

- Solução de NaOH a 4%.
- Solução Neutralizante.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.
- Água destilada estéril ou Solução Tampão Fosfato pH 6,8.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Tubos de centrifuga de polipropileno, estéreis, descartáveis, com fundo cônico, de 30 ml ou de 50 ml, com tampa de rosca.
- Estante para tubos de centrifuga 30 ml ou 50 ml.
- Gaze estéril em pedaços.
- Pipetas estéreis de 5 ml, 2 ml e Pasteur.
- Recipiente à prova de respingos contendo Solução de Fenol a 5% num volume que ocupe 2 cm do frasco. Por exemplo: um funil de vidro acoplado a boca de um frasco Erlenmeyer ou de um balão de vidro (corpo largo e boca estreita).
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Meios de cultura: 2 tubos com meio LJ ou 3 tubos quando houver suspeita de micobacteriose, um tubo com meio LJ-PNB, para cada amostra. Na suspeita de *M. bovis*, acrescentar 2 tubos com meio LJ-piruvato. Na suspeita de

M. haemophilum acrescentar um tubo com meio LJ com adição de citrato férrico amoniacal.

- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados.
- Lâminas para baciloscopia.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.
- Fita de pH e placa de Petri ou tubo de ensaio pequeno.

Procedimentos de organização

1. Identificar o número de registro da amostra clínica na lâmina, nos tubos de meios de cultura e nos tubos de centrifuga.
2. Preparar a CSB conforme descrito no Capítulo 11.

Realizar o procedimento 3 fora da CSB

3. Organizar os potes das amostras a serem descontaminadas, observando a correspondente identificação do número de registro no corpo do pote, no tubo de centrifuga, nos tubos de meios de cultura e na lâmina. Colocar os tubos de centrifuga e os de meio de cultura em uma mesma estante.

Realizar os procedimentos de 4 a 6 dentro da CSB

4. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.
5. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.
6. Colocar as amostras que serão descontaminadas de acordo com o número de ordem de registro, atrás da bandeja.

Procedimentos de realização

- Verificar as orientações de pré-tratamento das amostras descrito no Quadro 1. Acompanhar o Fluxograma do item 7.17.3.1 - Figura 2 do Anexo deste Capítulo.

Realizar os procedimentos de 1 a 6 dentro da CSB

1. Colocar em cima da bandeja de metal somente o pote da amostra que será processada.
2. Transferir a amostra, no máximo 5 ml, para o tubo de centrifuga de 30 ml ou 50 ml, deixando escorrer suavemente o escarro pela parede interna do tubo, cuidando para não derramar. Caso escorra o material para fora do tubo, limpar com gaze embebida em Solução de Fenol a 5%

3. Colocar o tubo de centrífuga contendo a amostra em uma estante.
4. Repetir esse procedimento para todas as amostras.
5. Adicionar com pipeta estéril a cada um dos tubos de centrífuga a Solução de NaOH 4%, na quantidade correspondente ao mesmo volume da amostra. Usar uma pipeta para cada amostra.
6. Fechar bem os tubos de centrífuga e agitar com a mão ou em agitador mecânico até formar uma mistura bem homogênea.

Realizar o procedimentos 7 fora da CSB

7. Colocar os tubos de centrífuga na estufa $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, para fluidificação-descontaminação.

Realizar os procedimentos 8 e 9 dentro da CSB

8. Completar até o volume de 30 ml ou 50 ml com Água destilada estéril ou Solução Tampão Fosfato pH 6,8.
9. Proceder à neutralização gotejando a Solução Neutralizante até o material apresentar a cor amarela âmbar. Após cada gota deve-se agitar suavemente o tubo para homogeneizar. A cor amarela âmbar indica que houve mudança do pH para a faixa entre 6,5 e 7,2 e que a amostra está adequada para ser semeada. Em caso de dúvida, quando houver mudança de cor mas sem aparecer a cor âmbar característica, por exemplo, durante a neutralização de materiais sanguinolentos, é preciso utilizar a fita de pH para verificar se houve a viragem. Para tanto, colocar com uma pipeta estéril, uma gota da amostra que está sendo processada, sobre uma fita de pH dentro de uma placa de Petri ou um pequeno tubo de ensaio e observar o pH da amostra. Se o pH estiver acima de 7,2 continuar gotejando a Solução Neutralizante. Se o pH estiver abaixo de 6,5 gotejar a Solução de NaOH a 4%, gota a gota até atingir o pH adequado.

Realizar os procedimentos de 10 a 12 fora da CSB

10. Centrifugar a $3.000 \times g$ por 15 minutos.
11. Após a parada total da centrífuga, esperar 5 minutos para abrir.
12. Retirar as capas fechadas da centrífuga e colocar na CSB.

Realizar os procedimentos de 13 a 15 dentro da CSB

13. Abrir as capas e acondicionar os tubos da centrífuga em uma estante. Desprezar o sobrenadante de cada tubo de centrífuga em um recipiente a prova de respingos;
14. Semear com pipeta estéril, 0,1ml do sedimento em cada um dos tubos de meio de cultura, distribuindo em toda a superfície do meio. No caso de existir água

de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze ou papel de filtro estéril antes de semear. Preparar o esfregaço da baciloscopia concentrada depositando duas gotas do sedimento na lâmina;

15. Fechar os tubos de meio de cultura, sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante;

Realizar os procedimentos de 16 a 20 fora da CSB

16. Retirar os tubos de meios de cultura semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio.
17. Acondicionar os tubos de meios inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima. Cuidar para não sobrepor os tubos evitando acidentes ao transportar a bandeja. Identificar a data de semeadura na bandeja.
18. Realizar a incubação dos tubos de cultura semeados conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.
19. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.
20. Efetuar a fixação, coloração da lâmina de baciloscopia após concentração e leitura conforme descrito no Capítulo 6.

7.10.2 Método de N-Acetil-L-Cisteína-Hidroxido de Sódio (NALC-NaOH)

Descrição

Esse método utiliza uma solução depurante contendo N-acetil-L-cisteína (NALC) como agente de liquefação e o uso de NaOH como descontaminante numa concentração final de 2%. O método também utiliza o Citrato de sódio com a função de sequestrar os íons de metais pesados que estando presentes na amostra clínica poderiam inativar a NALC. Essa solução depurante é compatível com todos os meios de cultura, sendo recomendado para todas as amostras clínicas, principalmente as paucibacilares. É o método recomendado para descontaminar amostras que serão semeadas em sistemas automatizados^{1,7,12,13,14,15}.

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3. Abrir um pote de cada vez, com cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Observar a capacidade da centrífuga para estabelecer o número de tubos a serem trabalhados a cada lote. A centrífuga deve ser preferencialmente refrigerada para

evitar que o aquecimento interfira na viabilidade da micobactéria. As caçapas devem ter proteção individual para evitar contaminação pela produção de aerossóis durante a centrifugação e devem ser abertas dentro da CSB.

- A Solução Depurante, que deverá ser adicionada à amostra clínica para a fluidificação-descontaminação, é composta pela mistura de NaOH a 4%, Citrato de sódio a 2,9% e NALC. No Anexo 7.17 deste Capítulo está descrita a preparação de todos os reagentes.
- A Solução de NaOH a 4% e a Solução de Citrato de sódio a 2,9% são preparadas separadamente e após, são misturadas v/v, de acordo com o volume final desejado. A mistura NaOH-Citrato de sódio pode ser preparada em frasco com tampa de rosca, esterilizada e guardada sob refrigeração.
- A quantidade de NALC a ser pesada depende da quantidade de amostras que serão tratadas (calculada para um dia de trabalho) e sua adição deve ser feita no momento do uso, pois perde sua atividade dentro de 24 horas.

Materiais

Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica (CSB).
- Agitador mecânico
- Centrífuga com rotor para tubos de 50 ml.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e outra para $30 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pipetador automático ou manual.
- Cronômetro.

Reagentes

- Solução Depurante (Solução de NaOH a 4%, Solução de Citrato de sódio a 2,9%, NALC).
- Solução Tampão Fosfato pH 6,8.
- Solução salina estéril.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Tubos de centrifuga de polipropileno, estéreis, descartáveis, com fundo cônico, de 30 ml ou de 50 ml, com tampa de rosca.
- Estante para tubos de centrífuga de 50 ml.
- Gaze estéril em pedaços.
- Pipetas estéreis de 5 ml e de 10 ml.

- Recipiente à prova de respingos contendo Solução de Fenol a 5% num volume que ocupe 2 cm do frasco. Por exemplo: um funil de vidro acoplado a boca de um frasco Erlenmeyer ou de um balão de vidro (corpo largo e boca estreita).
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Meios de cultura: 2 tubos com meio LJ ou 3 tubos quando houver suspeita de micobacteriose, um tubo com meio LJ-PNB, para cada amostra.
- Na suspeita de *M. bovis*, acrescentar 2 tubos com meio LJ-piruvato. Na suspeita de *M. haemophilum* acrescentar um tubo com meio LJ com adição de citrato férrico amoniacal.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados.
- Lâminas para baciloscopia.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

Procedimentos de organização

1. Identificar o número de registro da amostra clínica na lâmina, nos tubos de meios de cultura e no tubo de centrífuga.
2. Preparar a CSB conforme descrito no Capítulo 11.
3. Preparar diariamente a solução de trabalho, calculando a quantidade necessária de acordo com a quantidade de amostras a serem processadas (v/v)

Realizar o procedimento 4 fora da CSB

4. Organizar os potes das amostras a serem descontaminadas, observando a correspondente identificação do número de registro no corpo do pote, no tubo de centrífuga, nos tubos de meios de cultura e na lâmina. Colocar os tubos de centrífuga e os de meio de cultura em uma mesma estante.

Realizar os procedimentos de 5 a 7 dentro da CSB

5. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.
6. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.
7. Colocar as amostras que serão descontaminadas de acordo com o número de ordem de registro, atrás da bandeja.

Procedimentos de realização

- Verificar as orientações de pré-tratamento das amostras descritas no Quadro 1. Acompanhar o Fluxograma do item 7.17.3.2 – Figura 3 do Anexo deste Capítulo.

Realizar os procedimentos de 1 a 8 dentro da CSB

1. Colocar em cima da bandeja somente o pote da amostra que será processada.
2. Transferir a amostra para o tubo de centrífuga de 50 ml, deixando escorrer suavemente o escarro pela parede interna do tubo, cuidando para não derramar. Caso escorra o material para fora do tubo, limpar com gaze embebida em Solução de Fenol a 5%.
3. Colocar o tubo de centrífuga contendo a amostra em uma estante.
4. Repetir esse procedimento para todas as amostras.
5. Adicionar com pipeta estéril a cada um dos tubos de centrífuga a Solução Depurante, na quantidade correspondente ao mesmo volume da amostra. Usar uma pipeta para cada amostra.
6. Fechar bem os tubos de centrífuga e inverter cuidadosamente o tubo para misturar bem, evitando a agitação forte que resulta em oxidação e inativação da NALC.
7. Deixar os tubos de centrífuga em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente, para fluidificação/descontaminação.
8. Completar até o volume de 50 ml com Solução Tampão Fosfato pH 6,8.

Realizar os procedimentos de 9 a 11 fora da CSB

9. Centrifugar a 3.000 x g por 15 minutos.
10. Após a parada total da centrífuga, esperar 5 minutos para abrir.
11. Retirar a caçapas fechadas da centrífuga e colocar na CBS.

Realizar os procedimentos de 12 a 15 dentro da CSB

12. Abrir as caçapas e acondicionar os tubos da centrífuga em uma estante. Desprezar o sobrenadante de cada tubo de centrífuga em um recipiente a prova de respingos.
13. Ressuspender o sedimento com 0,3 ml de Água destilada estéril ou solução salina.
14. Semear com pipeta estéril 0,1ml do sedimento em cada um dos tubos de meio de cultura, distribuindo em toda a superfície do meio. No caso de existir água de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze estéril ou papel de filtro antes de semear. Preparar o esfregaço da baciloscopia concentrada depositando duas gotas do sedimento na lâmina.

15. Fechar os tubos com meio de cultura sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Realizar os procedimentos de 16 a 20 fora da CSB

16. Retirar os tubos de meios de cultura semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio.
17. Acondicionar os tubos de meios de cultura, inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima. Cuidar para não sobrepor os tubos evitando acidentes ao transportar a bandeja. Identificar a data de semeadura na bandeja.
18. Realizar a incubação dos tubos de meio de cultura semeados conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.
19. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.
20. Efetuar a fixação, coloração da lâmina de baciloscopia concentrada e leitura conforme descrito no Capítulo 6.

7.10.3 Método de Ogawa-Kudoh

Descrição

Esse método é de execução simples, rápida e fácil, utiliza o NaOH 4% como agente descontaminante, sendo recomendado para a utilização em laboratórios de menor complexidade, pois não requer o uso de centrífuga. Indicado para amostras de escarro espontâneo. Utiliza *swab* de algodão que, após ser embebido na parte purulenta do escarro, é colocado em NaOH 4% por até 2 minutos. Após é semeado diretamente em meio de OK (meio levemente acidificado pH 6,4)^{1,16,17}.

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3. Abrir um pote de cada vez, com cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Observar a forma correta de utilizar o bico de Bunsen de modo que a chama fique entre o técnico que está manipulando e a amostra.
- Esse método utiliza apenas o meio de OK e é indicado para amostras de escarro.

Materiais

Equipamentos

- Bico de Bunsen.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pipetador automático ou manual.
- Cronômetro.

Reagentes

- Solução de NaOH a 4%.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Gaze estéril em pedaços.
- *Swab* estéril: palito de madeira com algodão hidrófilo enrolado na ponta, esterilizado em autoclave ou forno de Pasteur que atinja temperatura de 200°C . Observar que o volume de algodão deverá ser suficiente para absorver a maior quantidade de escarro e não ultrapassar o diâmetro do tubo onde será introduzido. A altura do algodão enrolado deverá ser de modo a ficar submersa no volume de 3 ml de Solução de NaOH a 4%.
- Tubos de ensaio estéril para colocar 3 ml de Solução de NaOH a 4%.
- Estante para os tubos de ensaio estéril 20 x 150 mm.
- Pipetas estéreis de 5 ml.
- Um recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado e um recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Meios de cultura: 2 tubos com meio OK, um tubo com meio OK-PNB, para cada amostra. Na suspeita de *M. bovis*, acrescentar 2 tubos com meio OK-piruvato.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados.
- Lâminas para baciloscopia.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

Procedimentos de organização

1. Identificar o número de registro da amostra clínica na lâmina, nos tubos de meios de cultura e no tubo estéril.

2. Forrar a bancada com papel absorvente ao redor do bico de Bunsen e colocar atrás do mesmo a bandeja de metal, forrada com papel absorvente, onde serão realizados os procedimentos.
3. Organizar os potes das amostras por trás da bandeja, e colocar a lâmina correspondente à identificação da amostra em frente ao pote.
4. Colocar os tubos de ensaio estéril onde será adicionado a Solução de NaOH a 4% em uma estante e os tubos de meios de cultura em outra.

Procedimentos de realização

Sendo indicado somente para amostras de escarro espontâneo, não necessitam de pré-tratamento.

1. Colocar 3 ml de Solução de NaOH a 4% em cada tubo estéril já identificado, utilizando pipeta estéril e auxílio de pipetador automático ou manual.
2. Colocar em cima da bandeja de metal somente o pote da amostra que será processada e a correspondente lâmina.
3. Abrir lentamente o pote da amostra a ser processada.
4. Preparar a baciloscopia direta conforme descrito no Capítulo 6.
5. Introduzir o *swab* no pote contendo escarro, girando cuidadosamente dentro da amostra até que o mesmo fique impregnado com a porção mais purulenta.
6. Inserir o *swab* impregnado com a amostra no tubo contendo Solução de NaOH a 4%, sem encostar na parede, e deixar em repouso até 2 minutos (máximo).

Atenção: No caso de existir água de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze estéril ou papel de filtro antes de semear.

7. Após esse tempo, passar o *swab* sobre a superfície dos 2 tubos com meio OK e OK-PNB mediante movimentos rotatórios e em zigue-zague de maneira a espalhar bem o inóculo. Se houver suspeita de infecção pelo *M. bovis* passar o *swab* sobre a superfície dos 2 tubos com o meio OK, a seguir no meio OK-piruvato e por último no meio OK-PNB. O PNB é um inibidor químico de crescimento do CMTB.
8. Descartar o *swab* no recipiente plástico.
9. Fechar os tubos de meio de cultura sem rosquear a tampa até o fim e colocar na estante.
10. Repetir os procedimentos de 1 a 9 para todas as amostras.
11. Fechar as tampas. Acondicionar os tubos de meios de cultura inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa do tubo fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima. Cuidar para não sobrepor os tubos evitando acidentes ao transportar a bandeja. Identificar a data de semeadura na bandeja.
12. Guardar na geladeira os potes de amostras, para repetição, se necessário.

13. Realizar a limpeza e descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado conforme descritos no Capítulo 3.
14. Efetuar a coloração da lâmina de baciloscopia direta e leitura conforme descritos no Capítulo 6.
15. Realizar a incubação dos tubos de meio de cultura semeados conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.

7.10.4 Método do Ácido oxálico

Descrição

É um método alternativo, particularmente indicado para amostras pulmonares que contém *Pseudomonas* sp, como, por exemplo, o escarro de pacientes com fibrose cística ou amostras de urina^{12,13}.

Materiais

Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica (CSB).
- Agitador mecânico
- Centrífuga com rotor para tubos de 50 ml.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pipetador automático ou manual.
- Cronômetro.

Reagentes

- Solução de Ácido oxálico a 5%.
- Solução salina estéril.
- Solução Indicadora (NaOH + Vermelho de fenol).
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Tubos de centrifuga de polipropileno, estéreis, descartáveis, com fundo cônico, de 30 ml ou de 50 ml, com tampa de rosca.
- Estante para tubos de centrifuga de 50 ml.
- Meios de cultura: 2 tubos com meio LJ para cada amostra.
- Gaze estéril em pedaços.
- Pipetas estéreis de 5 ml e de 10 ml.

- Recipiente à prova de respingos contendo Solução de Fenol a 5% num volume que ocupe 2 cm do frasco. Por exemplo: um funil de vidro acoplado a boca de um frasco Erlenmayer ou de um balão de vidro (corpo largo e boca estreita).
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados.
- Lâminas para baciloscopia.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

Procedimentos de organização

1. Identificar o número de registro da amostra clínica na lâmina, nos tubos de meios de cultura e no tubo de centrífuga.
2. Preparar a CSB conforme descrito no Capítulo 11.

Realizar o procedimento 3 fora da CSB

3. Organizar os potes das amostras a serem descontaminadas, observando a correspondente identificação do número de registro no corpo do pote, no tubo de centrífuga, nos tubos de meios de cultura e na lâmina. Colocar os tubos de centrífuga e os de meio de cultura em uma mesma estante.

Realizar os procedimentos de 4 a 6 dentro da CSB

4. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.
5. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.
6. Colocar as amostras que serão descontaminadas de acordo com o número de ordem de registro, atrás da bandeja.

Procedimentos de realização

- Verificar as orientações de pré-tratamento das amostras descritas no Quadro 1. Acompanhar o Fluxograma do item 7.17.3.4 – Figura 5 do Anexo deste Capítulo.

Realizar os procedimentos de 1 a 8 dentro da CSB

1. Colocar em cima da bandeja somente o pote da amostra que será processada.

2. Transferir a amostra para o tubo de centrífuga de 50 ml, deixando escorrer suavemente o escarro pela parede interna do tubo, cuidando para não derramar. Caso escorra o material para fora do tubo, limpar com gaze embebida em Solução de Fenol a 5%.
3. Colocar o tubo de centrífuga contendo a amostra em uma estante.
4. Repetir esse procedimento para todas as amostras.
5. Adicionar com pipeta estéril a cada um dos tubos de centrífuga a Solução de Ácido oxálico a 5%, na quantidade correspondente ao mesmo volume da amostra.
6. Fechar bem os tubos de centrífuga e agitar os tubos em agitador mecânico.
7. Deixar os tubos de centrífuga em repouso por 30 minutos, para fluidificação-descontaminação agitando de vez em quando.
8. Completar até o volume de 50 ml com Solução salina estéril.

Realizar os procedimentos de 9 a 11 fora da CSB

9. Centrifugar a 3.000 x g por 15 minutos.
10. Após a parada total da centrífuga, esperar 5 minutos para abrir.
11. Retirar as capas fechadas da centrífuga e colocar na CSB.

Realizar os procedimentos de 12 a 16 dentro da CSB

12. Abrir as capas e acondicionar os tubos da centrífuga em uma estante. Desprezar o sobrenadante de cada tubo de centrífuga em um recipiente a prova de respingos.
13. Neutralizar o sedimento com Solução indicadora até o aparecimento de cor rósea.
14. Semear com pipeta estéril, 0,1 ml do sedimento em cada um dos tubos de meio de cultura, distribuindo em toda a superfície do meio. No caso de existir água de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze ou papel de filtro estéreis antes de semear. Preparar o esfregaço da baciloscopia concentrada depositando duas gotas do sedimento na lâmina.
15. Fechar os tubos de meio de cultura sólidos sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Realizar os procedimentos de 17 a 21 fora da CSB

16. Retirar os tubos de meios sólidos semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio.
17. Acondicionar os tubos de meios sólidos, inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a su-

perfície do meio voltada para cima. Cuidar para não sobrepor os tubos evitando acidentes ao transportar a bandeja. Identificar a data de semeadura na bandeja.

18. Realizar a incubação dos tubos de cultura sólidos semeados conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.
19. Realizar a limpeza e descontaminação da bancada e o descarte do material conforme descrito no Capítulo 3.
20. Efetuar a fixação, coloração da lâmina de baciloscopia concentrada e leitura conforme descrito no Capítulo 6.

OBSERVAÇÃO: Uma alternativa é acrescentar Ácido oxálico a 5% no sedimento obtido após centrifugação pelo método NALC-NaOH.

7.11 Procedimentos para incubação nos métodos clássicos

Após a realização das etapas de pré-tratamento, fluidificação-descontaminação e semeadura nos meios de cultura indicados, esses são colocados em temperaturas apropriadas e constantes, para o tempo de incubação necessário ao desenvolvimento de micobactérias.

1. Inclinar os tubos de meios de cultura semeados em bandejas de polipropileno, com a superfície do meio voltada para cima e as tampas semi-rosqueadas, para garantir a secagem do inóculo.
2. Incubar à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ os tubos de meio de cultura semeados com qualquer tipo de amostra clínica, visando o desenvolvimento das espécies do CMTB.
3. No caso de meios de cultura com adição de piruvato para pesquisa de *M. bovis*, incubar à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e, se possível, dar condições de microaerofilia (5 a 10% de CO_2).
4. No caso de suspeita clínica de patologia causada por *M. marinum* e *M. ulcerans* (amostras oriundas de tecido cutâneo), incubar à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ um dos tubos de meio de cultura.
5. No caso de meios de cultura com adição de citrato férrico amoniacal para pesquisa de *M. haemophilum*, incubar à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.
6. Após 48 horas de incubação, conferir se há contaminação em todos os tubos, rosquear completamente as tampas e conservar incubados pelo tempo recomendado no item 7.11.

7.12 Procedimentos de leitura, interpretação e registro dos resultados nos métodos clássicos

Realizar a leitura dos tubos semeados em bancada bem iluminada, próxima à janela ou com foco de luz próximo (luminária), após 48 horas de incubação e posteriormente de 7 em 7 dias (leituras semanais) até completar 8 semanas.

Nos meios de cultura sólidos, as colônias de micobactérias podem ser visualizadas a olho nu, entre 3 e 7 dias (espécies de crescimento rápido) ou após (espécies de crescimento lento). Em amostras paucibacilares podem ser necessárias até 8 semanas para as colônias se tornarem visíveis.

No caso de meios de cultura com adição de piruvato para pesquisa de *M. bovis*, o tempo de incubação é de até 16 semanas. O crescimento é disgônico, com colônias pequenas, lisas e planas.

Para acompanhar a leitura, observar o Fluxograma de Leitura das Culturas em Meios Sólidos descritos no item 7.17.3.6 do anexo deste capítulo.

Os formulários “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” estão descritos no Capítulo 1.

Procedimentos de leitura após 48 horas de incubação

1. Fechar os tubos rosqueando as tampas completamente.
2. Verificar a contaminação (presença de colônias microbianas – bactérias ou fungos) pela mudança de coloração ou liquefação dos meios. Quando presentes, descartar o tubo. Se todos os tubos estiverem contaminados e não existir mais a amostra, registrar no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e emitir o resultado no “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” como “Cultura contaminada. Solicitamos nova amostra” (**Situação 3**). A cultura não pode ter continuidade apenas com o tubo com meio OK-PNB ou LJ-PNB.
3. Voltar a incubar os tubos em que não houve contaminação ou alteração do meio.

Procedimentos de leituras semanais

1. Registrar a leitura semanal no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL com todas as observações, referentes a cada tubo de cultura de cada amostra, como: data da leitura, número de colônias visualizadas de acordo com a escala semiquantitativa, características morfológicas das colônias em relação à presença de pigmento, aspecto (lisa ou rugosa), e contaminação parcial ou total de cada tubo.

Os critérios para leitura das culturas em meio sólido são apresentados na escala semiquantitativa abaixo.

Escala Semiquantitativa

- Menos de 20 colônias = “Cultura Positiva” (número de colônias).
- De 20 a 100 colônias = “Cultura Positiva” (+).
- Mais de 100 colônias separadas = “Cultura Positiva” (++)
- Colônias confluentes (tapete) = “Cultura Positiva” (+++).

As seguintes situações são possíveis

2. **Situação 1:** Incubar novamente os tubos em que não são visualizadas colônias, realizar as leituras nas próximas semanas até completar oito semanas. Permanecendo negativos na oitava semana desprezar os tubos registrar no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade”, no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL e emitir o resultado no “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” como “Cultura Negativa”.
3. **Situação 2:** Para os tubos onde são visualizadas colônias, realizar a baciloscopia conforme descrito no Capítulo 6, para confirmar a presença de BAAR.

ATENÇÃO: Para os laboratórios que realizarem o Método de Ogawa-Kudoh e não possuírem CSB, não realizar a baciloscopia desses tubos nesses laboratórios. Os tubos onde são visualizadas colônias devem ser encaminhados para um Laboratório de Referência conforme descrito no Capítulo 1, pois a baciloscopia realizada a partir de colônias aumenta muito o risco biológico.

Quando há presença de BAAR:

- **Situação 2A:** após 7 dias de incubação, havendo visualização de mais de 20 colônias de cor creme e rugosas, em um ou mais dos tubos com meio LJ ou OK e ausência de colônias no tubo com meio LJ-PNB ou OK-PNB consultar a escala semi-quantitativa para a interpretação dos resultados, levando em conta o número de colônias visualizadas. A seguir:
 - a) registrar todas as informações observadas e o resultado – “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestiva de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB)” no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL.
 - b) separar o tubo com meio LJ ou OK com crescimento e encaminhar para a identificação e para o TS se atender aos critérios e realização;

- c) emitir o resultado no “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” como “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestiva de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB)”.
- **Situação 2B:** após 7 dias de incubação, havendo visualização de menos de 20 colônias de cor creme e rugosas, em um ou mais dos tubos com meio LJ ou OK e ausência de colônias no tubo com meio LJ-PNB ou OK-PNB, consultar a escala semi-quantitativa para a interpretação dos resultados, levando em conta o número de colônias visualizadas. A seguir:
 - a) registrar no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL todas as informações observadas e o resultado “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestiva de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB)”.
 - b) realizar subcultivo e após encaminhar para a identificação e TS se atender aos critérios de realização.
 - c) emitir no “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” o resultado como “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestiva de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB)”.
- **Situação 2C:** havendo visualização de mais de 20 colônias com ou sem pigmento, lisas, opacas ou brilhantes, em um ou mais dos tubos com meio LJ ou OK e no tubo com meio LJ-PNB ou OK-PNB antes ou após 7 dias de incubação, consultar a escala semi-quantitativa e:
 - a) registrar no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL o número de colônias e todas as demais informações observadas e o resultado “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestivas de micobactérias não causadora de tuberculose (MNT)”.
 - b) separar um dos tubos com meio LJ ou OK e encaminhar para a identificação TS se atender aos critérios de realização.
 - c) emitir no “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” o resultado “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestivas de micobactérias não causadora de tuberculose (MNT)”.
- **Situação 2D:** havendo visualização de menos de 20 colônias com ou sem pigmento, lisas, opacas ou brilhantes, em um ou mais dos tubos com meio LJ ou OK e no tubo com meio LJ-PNB ou OK-PNB, antes ou após 7 dias de incubação, consultar a escala semi-quantitativa:
 - a) registrar no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e no sistema de informação Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL o número de colônias, todas as demais informações

- observadas e o resultado como “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestivas de micobactérias não causadora de tuberculose (MNT)”.
- b) separar um dos tubos com meio LJ ou OK, realizar subcultivo antes de encaminhar para a identificação e TS se atender aos critérios de realização.
 - c) Emitir no “Formulário de solicitação e resultado de exame – cultura para micobactérias” o resultado “Cultura positiva para BAAR (.....), sugestivas de micobactérias não causadora de tuberculose (MNT)”.
4. Para a situação 2D, se o isolamento dessas colônias foi a partir de amostra colhida de sítio não estéril, solicitar novas amostras (3 isolados de um mesmo tipo de amostra). Esse procedimento é para verificar se o isolamento de colônias de micobactérias indica uma presença temporária ou se representa um possível quadro clínico de micobacteriose.
 5. Em todas as situações, realizar a identificação conforme descrito no Capítulo 8. Se o laboratório que não estiver habilitado a realizar a identificação, encaminhar para um Laboratório de Referência conforme descrito no Capítulo 1.
 6. Quando a baciloscopia não confirma a presença de BAAR, indica que há contaminação. Se o tubo de meio estiver contaminado parcialmente, incubar novamente. Se todos os tubos estiverem contaminados, informa-se o resultado como “Cultura contaminada” (**Situação 3**). A cultura não pode ter continuidade apenas com o tubo com meio OK-PNB ou LJ-PNB.

7.13 Subcultivo

Descrição

Consiste na preparação de uma suspensão bacteriana a partir de uma cultura com raras colônias que serão inoculadas em meios com LJ ou OK, cujo objetivo é aumentar a massa bacteriana, pois para realizar as provas de identificação das espécies de micobactérias é necessário um crescimento abundante.

Precaução

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3. Abrir um tubo de cultura de cada vez, com cuidado para evitar a formação de aerossóis.

Materiais

Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica (CSB).
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Pipetador automático ou manual.
- Agitador mecânico.

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Tubos de ensaio 20 x 150 mm, de paredes reforçadas, com tampa de rosca, contendo 10 pérolas de vidro, estéreis.
- Estante para os tubos de ensaio estéril 20 x 150 mm.
- Gaze estéril em pedaços.
- Pipetas estéreis de 1 ml.
- Alça descartável.
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Meios de cultura: 2 tubos com meio LJ ou OK.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

Procedimentos de organização

Realizar os procedimentos de 1 a 3 fora da CSB

1. Identificar o número da cultura nos tubos de meios com LJ ou OK e no tubo de ensaio com pérolas.
2. Preparar a CSB conforme descrito no Capítulo 11.
3. Organizar os tubos de cultura observando a correspondente identificação do número de registro no tubo de ensaio com pérolas e nos tubos de meios de cultura. Colocar os tubos de ensaio com pérolas e os de meio de cultura em uma mesma estante.

Realizar os procedimentos de 4 a 5 dentro da CSB

4. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.

5. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.

Procedimentos de realização

Realizar os procedimentos de 1 a 5 dentro da CSB

1. Transferir, com alça descartável estéril, algumas colônias da cultura para um tubo de ensaio com pérolas e 1 ml de Água destilada estéril.
2. Homogeneizar em agitador mecânico.
3. Manter em repouso por 10 minutos.
4. Semear com pipeta estéril 0,1 ml da suspensão em 2 tubos com meio LJ ou OK. No caso de existir água de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze ou papel de filtro antes de semear.
5. Fechar os tubos com meio de cultura sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Realizar os procedimentos de 6 a 10 fora da CSB

6. Retirar os tubos de meios de cultura semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio.
7. Acondicionar os tubos de meios de cultura, inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima. Cuidar para não sobrepor os tubos evitando acidentes ao transportar a bandeja. Identificar a data de semeadura na bandeja.
8. Realizar a incubação dos tubos de meio de cultura semeados conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.
9. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado de acordo com as instruções descritas no Capítulo 3.
10. Realizar a leitura das culturas conforme descrito no item 7.12 deste capítulo.

7.14 Sistemas comerciais automatizados de cultura

7.14.1 Descrição

Os sistemas comerciais automatizados de cultura são compostos por: (a) um frasco contendo meio de cultura com um sensor interno que pode ser colorimétrico, fluorimétrico ou de pressão, de acordo com o fabricante; (b) um suplemento antibiótico e de enriquecimento; e (c) uma incubadora para acondicionamento dos frascos inoculados com as amostras clínicas que monitoram de forma contínua a detecção do crescimento bacteriano. Podem ser usados para a maioria das amostras clínicas e apresentam a vantagem de detectar precocemente o crescimento bacteriano. Contribui para melhorar o diagnóstico de micobactérias^{14,15,16,18}.

7.14.2 Procedimentos de semeadura em sistemas comerciais

Precauções

- Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança, como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados conforme descrito no Capítulo 3.
- Dependendo do sistema comercial escolhido, amostras de sangue e medula óssea não poderão ser processadas, sendo que cada fabricante esclarece essas características. O pré-tratamento das amostras clínicas segue as mesmas recomendações para os métodos clássicos e a fluidificação-descontaminação das amostras deve ser realizada preferencialmente pelo método de NALC-NaOH. Semear em paralelo um tubo com meio LJ.

Observações

- As fórmulas para o preparo dos reagentes de fluidificação-descontaminação e do meio de cultura LJ estão descritas no anexo deste capítulo e Solução de Álcool a 70% estão descritas no Capítulo 3.

Materiais

Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica (CSB)
- Sistema de incubação e detecção automática a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Estufa bacteriológica convencional a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Micropipetas automáticas.

Reagentes

- Suplemento de enriquecimento (de acordo com o fabricante).
- Suplemento antibiótico liofilizado (de acordo com o fabricante).
- Solução salina estéril.
- Água destilada estéril.
- Solução de Álcool 70%.
- Solução Tampão Fosfato pH 6,8.
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos.

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandeja de metal.
- Estante para tubos de centrífuga de 30 ml e 50 ml.

- Amostras clínicas já descontaminadas (quando necessário) em tubos de 50 ml, com tampa de rosca.
- Criotubos.
- Ponteiras com barreiras, estéreis.
- Gaze estéril em pedaços.
- Recipiente à prova de respingos contendo Solução de Fenol a 5% num volume que ocupe 2 cm do frasco. Por exemplo: um funil de vidro acoplado à boca de um frasco Erlenmeyer ou de um balão de vidro (corpo largo e boca estreita).
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Meio de cultura sólido: 1 tubo com meio LJ.
- Frascos com meio de cultura líquido específico de cada sistema.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados.
- Lâminas para baciloscopia.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

Procedimentos de organização

- Verificar as orientações de pré-tratamento das amostras conforme descrito no item 7.5 deste capítulo e realizar a etapa de descontaminação pelo método NALC-NaOH, conforme descrito no item 7.10.2 deste capítulo.

Realizar os procedimentos de 1 a 7 fora da CSB

1. Separar os frascos de meio líquido de acordo com o número de amostras a ser inoculadas e deixar à temperatura ambiente de 30 a 60 minutos antes da inoculação.
2. Todas as amostras clínicas que foram descontaminadas pelo método NALC-NaOH devem estar nos tubos de centrífuga de 50 ml, devidamente identificadas com o número de registro e colocadas em estante. Ressuspender o sedimento com Solução Tampão Fosfato pH 6,8 até um volume final de 1 a 3 ml.
3. Identificar com o número de registro as amostras clínicas que não necessitam de descontaminação.
4. Identificar com o mesmo número de registro das amostras clínicas as lâminas, os frascos de meio líquido e os tubos com meio LJ correspondentes.
5. Cadastrar os frascos de meio líquido no sistema de incubação e detecção automática, pelo código de barras, de acordo com instruções do fabricante.
6. Preparar a CSB, conforme descrito no Capítulo 11.

7. Reconstituir o suplemento antibiótico com o suplemento de enriquecimento, dissolvendo com cuidado o liofilizado. **Atenção:** aliquotar o suplemento antibiótico reconstituído em criotubos, uma vez que a validade é de 7 dias quando guardado em refrigeração (2 a 8°C) e 30 dias em freezer (-20°C). Marcar a data de validade em cada criotubo.

Realizar os procedimentos de 8 a 10 dentro da CSB

8. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.
9. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.
10. Colocar as amostras de acordo com o número de ordem de registro, atrás da bandeja.

Procedimentos de realização

Realizar os procedimentos de 1 a 10 dentro da CSB

1. Colocar em cima da bandeja de metal a estante com as amostras previamente descontaminadas e/ou as amostras estéreis.
2. Desinfetar os frascos de meio líquido com Solução de Álcool a 70% e deixar secar a temperatura ambiente.
3. Para as amostras previamente descontaminadas assepticamente, adicionar com micropipeta o volume adequado do suplemento antibiótico reconstituído com o enriquecimento a cada frasco de meio líquido.
4. Para as amostras estéreis adicionar somente o suplemento de enriquecimento, com micropipeta, a cada frasco de meio líquido. **Atenção:** cuidado especial com a manipulação do suplemento de enriquecimento para não introduzir contaminantes no tubo de meio líquido.
5. Inocular assepticamente, com micropipeta, o volume de amostra recomendado pelo fabricante, no frasco de meio líquido.
6. Antes de colocar no sistema de incubação e detecção automática, desinfetar os frascos de meio líquido com Solução de Álcool a 70% e deixar a temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Colocar os tubos de meio líquido inoculados no sistema de incubação e detecção automática, de acordo com as instruções do manual do fabricante.
8. Inocular assepticamente, com micropipeta, a amostra previamente descontaminada ou a amostra não estéril em um tubo com meio LJ.
9. Preparar o esfregaço da baciloscopia concentrada depositando duas gotas do sedimento na lâmina.

10. Fechar os tubos de meio de cultura LJ sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Realizar os procedimentos de 11 a 16 fora da CSB

11. Retirar os tubos com meio LJ semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio.
12. Acondicionar os tubos de LJ, inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima.
13. Incubar na estufa a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) os tubos com meio LJ inclinados.
14. Realizar a incubação dos tubos de meio LJ semeados conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.
15. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado de acordo com as instruções descritas no Capítulo 3.
16. Realizar a leitura das culturas conforme descrito no item 7.12 para os meios LJ e item 7.14.2 para os meios líquidos deste capítulo.

7.14.3 Procedimentos para incubação nos sistemas comerciais

Após a realização das etapas de pré-tratamento, fluidificação-descontaminação e semeadura (inoculação) nos meios de cultura líquidos, incubar os mesmos em temperaturas apropriadas e constantes, durante o tempo necessário ao desenvolvimento de micobactérias. Seguir o protocolo do fabricante.

1. Colocar os frascos no sistema de incubação e detecção automática, onde serão monitorados continuamente durante 42 dias. **Atenção:** Nos sistemas automatizados que aceitam amostras de sangue, os frascos de meio líquido, inoculados com essas amostras deverão permanecer incubados por 56 dias, no mínimo.
2. Quando o sistema de incubação e detecção automatizada acusar que um frasco de meio líquido é positivo, retirar do sistema, assim como todos os frascos negativos após 42 dias de incubação.

7.14.4 Leitura dos meios líquidos nos sistemas comerciais

De acordo com o fabricante, o sistema de detecção de crescimento bacteriano pode ser realizado pelo consumo de O_2 ou produção de CO_2 . O sistema de leitura do equipamento registrará as variações de pressão que, mediante um programa de computador, próprio de cada sistema, indicará a existência ou não do crescimento micobacteriano e/ou bacteriano sinalizando o frasco de meio de cultura como positivo. Em todos os

frascos de meio líquido, detectados como positivos confirmar a presença de BAAR pela realização da baciloscopia, conforme descrita no Capítulo 6.

Realizar o procedimento 1 dentro da CSB

1. Agitar bem o frasco de meio líquido detectado como positivo para obter uma suspensão homogênea. Retirar com micropipeta metade do volume do frasco do meio líquido e acondicionar em um tubo cônico de 30 ml ou 50 ml.

Realizar os procedimentos de 2 a 4 fora da CSB

2. Centrifugar a 3.000 x g por 15 minutos.
3. Após a parada total da centrífuga, esperar 5 minutos para abrir.
4. Retirar as caçapas fechadas da centrífuga e colocar na CSB.

Realizar os procedimentos de 5 a 8 dentro da CSB

5. Abrir as caçapas e acondicionar os tubos em uma estante. Desprezar o sobrenadante de cada tubo de centrífuga em um recipiente a prova de respingos.
6. Ressuspender o sedimento com 1 ml de Água destilada estéril ou Solução salina estéril.
7. Passar o sedimento ressuspenso para um criotubo.
8. Preparar esfregaço de baciloscopia concentrada depositando duas gotas sobre lâmina de microscopia.

Realizar os procedimentos 9 a 12 fora da CSB

9. Manter o frasco de meio líquido com a metade do volume em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o criotubo com o sedimento ressuspenso a -20°C , enquanto se aguarda o resultado da baciloscopia.
10. Para o descarte dos frascos de meio líquidos, seguir as recomendações do fabricante.
11. Realizar a limpeza e descontaminação da CSB e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.
12. Efetuar a fixação, coloração da lâmina de baciloscopia concentrada e leitura conforme descrito no Capítulo 6.

Interpretação dos resultados

13. Se confirmada a presença de BAAR, semear com pipeta estéril, 0,1 ml do sedimento ressuspenso conservado no criotubo em 2 tubos com meio LJ ou OK. No caso de existir água de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze ou papel de filtro estéreis antes de semear em um tubo com meio LJ.

14. Realizar a incubação dos tubos de meio de cultura semeados, conforme descrito no item 7.11 deste capítulo.
15. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado de acordo com as instruções descritas no Capítulo 3.
16. Realizar a leitura das culturas conforme descrito no item 7.12 deste capítulo.
17. Se a baciloscopia apresentar resultado negativo, pode indicar resultado falso-positivo. Nesse caso, reincubar o frasco no sistema de incubação e detecção automatizada.
18. Se houver presença de BAAR e de outros microrganismos contaminantes centrifugar o restante do volume do frasco de meio líquido que foi conservado na estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (subitem 9) e proceder conforme descrito nos subitens 2 a 6. Juntar o sedimento obtido com aquele conservado a -20°C , proceder a descontaminação utilizando método descrito no item 7.10 e inocular em um novo frasco de meio líquido obedecendo as recomendações descritas nos subitens 1 a 6 da etapa de procedimentos de realização.

7.15 Controle de qualidade da cultura

7.15.1 Controle de qualidade interno

7.15.1.1 Descrição

Um sistema de garantia da qualidade é um conjunto de atividades planejadas que, inseridas ao processo de um produto ou serviço, tem como objetivo reduzir o risco de falhas. A garantia da qualidade com relação à cultura de micobactérias é um sistema projetado para melhorar continuamente a confiabilidade, eficiência e o uso dessa metodologia nos serviços que a realizam.

Os componentes do Sistema de Garantia da Qualidade (SGQ) são: Controle de Qualidade Interno (CQI); Melhoria da Qualidade e Teste de Proficiência. Para um SGQ ser efetivo, ele deve ser prático e factível.

O CQI da cultura é um dos componentes do Sistema de Garantia da Qualidade e é responsabilidade de cada laboratório que executa as técnicas. É um processo de efetivo e sistemático monitoramento interno do desempenho da bancada de trabalho, assegurando que a informação gerada seja confiável, precisa, reproduzível e sirva de mecanismo mediante o qual os laboratórios possam validar a competência dos serviços de diagnóstico.

Essa estratégia de controle é interna porque é feita dentro do próprio laboratório, que deve estabelecer na sua rotina de trabalho um sistema de controle sistemático e também registrar os resultados decorrentes desses controles. O responsável técnico deve realizar uma revisão periódica dos pontos críticos e monitorar os resultados com objetivo de evitar ou minimizar erros técnicos.

O CQI da cultura inclui o controle dos materiais, insumos, reagentes, equipamentos, procedimentos técnicos (metodologias), o monitoramento dos resultados e as medidas corretivas a serem aplicadas quando a imprecisão dos resultados excede os limites considerados aceitáveis.

Todos os procedimentos técnicos usados na rotina do laboratório devem ser aqueles publicados em livros, manuais ou periódicos de microbiologia reconhecidos pela comunidade científica e devem ser registrados em documentos que permitam seu monitoramento.

O uso correto e o monitoramento dos equipamentos estão descritos no Capítulo 11 e são fundamentais para a qualidade dos exames realizados e este implica executar um conjunto de procedimentos que registrem o desempenho de um determinado equipamento. Dessa forma, o profissional do laboratório é responsável não só pela técnica correta de uso, como também pelo monitoramento e a conservação de todos os equipamentos que fazem parte de sua rotina laboratorial.

No item 7.17.4 estão descritos modelos de formulários para acompanhar os procedimentos relativos ao CQI da cultura¹⁹. Esses documentos devem ser mantidos em lugar acessível no laboratório para uma consulta fácil e qualquer mudança deve ser registrada pelo profissional responsável.

7.15.1.2 CQI dos meios de cultura LJ e OK

Normalmente os meios de cultura para micobactérias utilizados nos laboratórios da rede pública são LJ ou OK, preparados pelo próprio laboratório. Cada novo lote de meios deve ser submetido ao CQI, antes de ser utilizado na rotina, considerando o processo de produção, os aspectos macroscópicos, controle de esterilidade e microbiológico dos meios prontos.

O laboratório deve organizar e estabelecer um cronograma de produção e CQI dos meios de cultura capaz de evitar a interrupção no suprimento e prejuízos à rotina do diagnóstico. Uma boa prática é reservar alguns tubos de meios de cultura aprovados pelo CQI para semear as amostras clínicas de rotina enquanto está sendo realizado o CQI do novo lote de meios.

As recomendações quanto ao preparo dos meios de cultura estão descritos no item 7.17.2 deste capítulo: qualidade dos ovos, homogeneização, volume e agitação durante a distribuição nos tubos, inclinação da bandeja do coagulador, temperatura e tempo de coagulação. Outras considerações são importantes ressaltar: utilizar produtos químicos de qualidade analítica certificada, vidraria limpa e esterilizada e seguir estritamente as instruções para preparação. Os formulários para registrar as atividades da produção dos meios de cultura estão descritas no item 7.17.4 deste capítulo.

Os meios de cultura em processo de CQI devem ser devidamente acondicionados em local separado dos meios de cultura já aprovados.

No período em que o lote de meios de cultura estiver sendo testado, este deverá ser guardado ao abrigo da luz, acondicionados em recipientes fechados com etiqueta externa contendo as informações do nome do meio, número do lote, data de fabricação e a advertência: “CQI em andamento”.

Os itens a seguir orientam para um roteiro de monitoramento do CQI dos meios de cultura produzidos pelo laboratório:

- (1º) produção do lote de meio de cultura.
- (2º) avaliação dos aspectos macroscópicos.
- (3º) controle de esterilidade.
- (4º) controle microbiológico.

Ao final, o lote pode ser ou não aprovado para uso na rotina do laboratório.

7.15.1.2.1 Aspectos macroscópicos

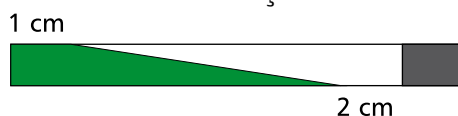
Após a coagulação os meios de cultura devem ser avaliados quanto ao aspecto macroscópico. Descartar os tubos de meios que estiverem fora dos critérios especificados a seguir:

Cor: considera-se normal quando a coloração é homogênea. Diferença de coloração entre os tubos de um mesmo lote de meios de cultura evidenciam que a homogeneização não foi completa durante a preparação. Uma coloração mais clara pode indicar alcalinidade do meio, menor concentração e/ou solução não fresca do verde malaquita ou resíduo de detergente no tubo. Uma coloração mais intensa pode indicar acidez do meio ou maior concentração de verde malaquita.

Consistência: o meio de cultura deverá estar firme e aderido às paredes do tubo de tal forma que não se rompa no momento da sementeira, especialmente com o uso do *swab*. Os meios com consistência mole são produto de mistura inadequada dos componentes e/ou do tempo ou temperatura da coagulação insuficiente.

Volume e inclinação: o volume ideal para um tubo de 20 x 150 mm é aquele que permite que, após a coagulação, o tubo tenha 1 cm na parte inferior preenchido com meio e o restante distribuído em bisel com espaço suficiente para uma boa leitura visual, terminando a 2 cm da rosca. Para que isso aconteça, acertar o volume envasado no tubo com a inclinação da bandeja do coagulador. A Figura 1 mostra a proporção do volume distribuído e a inclinação do tubo no momento da coagulação²⁰.

Figura 1. Meio de cultura com distribuição do meio e volumes corretos



Instituto Nacional de salud. Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia. Laboratorio de Micobactérias. Bacteriología del *Mycobacterium tuberculosis* y de Micobactérias no Tuberculosas. Manual de Procedimientos. Bogotá, Colômbia. 2001.

Textura: durante a distribuição do meio nos tubos de ensaio recomenda-se uma agitação constante para manter o meio homogeneizado e a agitação deve ser suave para evitar a formação de bolhas de ar. Mesmo com esse cuidado, se após a coagulação, houver orifícios e irregularidades na superfície do meio, estes indicam que a temperatura de coagulação foi superior a 80°C e a qualidade do meio está comprometida.

7.15.1.2.2 Controle de esterilidade

É o procedimento utilizado no laboratório para monitorar a esterilidade dos reagentes e insumos utilizados na produção dos meios de cultura e assim verificar a presença de contaminantes que prejudiquem o crescimento de micobactéria. Considera-se “contaminação” a presença de microrganismos que produzam enzimas proteolíticas capazes de liquefazer o meio que contém ovos, alterando a cor e a consistência do meio. A presença de alguns fungos só será percebida ao final de 2 semanas. Para realizar os testes, seguir os procedimentos.

1. Incubar todo o lote de meios produzidos por 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, para verificar a ausência de bactérias e deixar 1% do lote até completar duas semanas para verificar a ausência de fungos.
2. Afrouxar as tampas de rosca para que penetre o oxigênio e também proporcione a secagem da água de condensação formada durante a coagulação.
3. Havendo ausência de contaminação, o lote será considerado “aprovado pelo controle de esterilidade”.
4. Havendo contaminação total dos meios, o lote deverá ser considerado “reprovado pelo controle de esterilidade” e imediatamente descartado.
5. Caso ocorra contaminação parcial do lote, descartar os tubos contaminados e reincubar os outros por mais 24 horas. Após esse período, não havendo contaminação, o lote é considerado “aprovado pelo controle de esterilidade”; se houver contaminação, o lote é considerado “reprovado pelo controle de esterilidade” e imediatamente descartado.
6. O lote de meios “aprovados pelo controle de esterilidade” é encaminhado para o controle microbiológico.

7.15.1.2.3 Controle microbiológico

O controle microbiológico do meio de cultura utiliza cepas de referência e mede a capacidade do meio de cultura em proporcionar crescimento de micobactérias, avaliado pelo número de unidades formadoras de colônias estabelecidas como critérios de desempenho do meio de cultura.

Cepas de Referência

São culturas de microrganismos, padrão da descrição original da espécie, devidamente classificados segundo suas características qualitativas, a partir das quais novas espécies são descritas. São fornecidos por instituição de reconhecimento internacional: ATCC – American Type Culture Collection (EUA) e NCTC – National Collection of Type Cultures (Reino Unido). São utilizadas para controlar o desempenho e a qualidade de testes laboratoriais, de meios de cultura e de reagentes, pois mantêm sua estabilidade genética assegurada, desde que bem conservados e manipulados no laboratório. No Capítulo 10, são apresentadas as recomendações para conservação e manutenção. Também chamadas cepas-controle, amostras-tipo ou cepas-padrão.

A cepa de referência a ser utilizada no teste depende do meio de cultura que está sendo testado. Para testar os meios LJ ou OK utilizados para isolamento de micobactérias em geral, utiliza-se cepas de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ou *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177. Para os meios com piruvato de sódio a cepa utilizada é a de *M. bovis* ATCC 19210 e para meios com adição de citrato férrico amoniacal a cepa é de *M. haemophilum* ATCC 29548.

Procedimentos de realização

Realizar os procedimentos do controle microbiológico dentro da CSB. Os procedimentos para preparação da Escala McFarland estão descritos no item 7.17.2.9 deste capítulo.

1. Após a aprovação no item controle de esterilidade, separar 6 tubos do lote de meios em estudo, escolhidos ao acaso, para ser testado pelo controle microbiológico.
2. Preparar suspensão da cepa referência, padronizada pela turvação do tubo Nº 1 da Escala McFarland, a partir de um crescimento em meio sólido, em fase logarítmica (média de 21 dias): Retirar com alça bacteriológica descartável estéril o maior número possível de colônias para ser representativa.
3. Transferir para um tubo de ensaio com tampa de rosca, 20 x 150 mm (de paredes reforçadas), contendo 10 pérolas de vidro, estéreis e 0,5 (até 1 ml) de Água destilada estéril.
4. Homogeneizar em agitador mecânico por 20 a 30 segundos.
5. Manter em repouso por 10 minutos para sedimentar os grumos maiores.
6. Transferir, com pipeta estéril, o sobrenadante para outro tubo de ensaio estéril, tendo cuidado para não levar os grumos.
7. Ajustar a turvação da suspensão da cepa de referência com a turvação do tubo Nº 1 da Escala McFarland utilizando Água destilada estéril, gota a gota.
8. A partir dessa suspensão padronizada, efetuar seis novas diluições em escala decimal: Identificar seis tubos de ensaio de 20 x 150 mm e com tampa de rosca, estéreis, como 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .

9. Colocar 9 ml de Água destilada estéril em cada um deles.
10. Transferir 1 ml da suspensão padrão para o tubo 10^{-1} , agitar no agitador mecânico.
11. Trocar a pipeta e seguir as diluições, transferindo 1 ml para o tubo 10^{-2} e assim sucessivamente até o tubo 10^{-6} . Para cada diluição utilizar novas pipetas estéreis.
12. Identificar 2 tubos do lote de meios em estudo como 10^{-3} , 2 tubos como 10^{-5} e 2 como 10^{-6} e inocular 0,1 ml das diluições nesses tubos.
13. Acondicionar os tubos de meios inoculados em bandeja de polipropileno, inclinados de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima.
14. Incubar em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas e após fechar as tampas completamente e aguardar na estufa.
15. Após 20 dias, realizar a leitura em cada um dos tubos de cada diluição e registrar as contagens correspondentes das colônias (UFC = Unidade Formadora de Colônias). Obter a média das UFC, de forma separada para cada diluição.

Interpretação dos resultados

Após obter a média do número de colônias em cada diluição, para o crescimento nos meios de cultura em estudo, interpretá-los comparando com o número de colônias esperado para cada diluição, como segue:

- Tubo 10^{-3} : crescimento confluyente de colônias (incontáveis)
- Tubo 10^{-5} : crescimento de 50 a 150 UFC (colônias contáveis)
- Tubo 10^{-6} : crescimento de 1 ou 2 colônias

O lote de meios de cultura será considerado “aprovado pelo controle microbiológico” quando a média das UFC forem compatíveis com as médias das UFC esperadas.

Se nesse período não houver crescimento de nenhuma colônia, ou raras colônias no tubo 10^{-3} , o lote em estudo não está satisfatório e as amostras semeadas neste lote estão comprometidas. Nesse caso, identificam-se quais as amostras foram semeadas com esse lote e para aquelas cujos resultados são negativos devem ser semeadas novamente em outro lote aprovado.

O lote deve ser etiquetado: “aprovado pelo CQI”, assim como as demais identificações, nome do produto, número do lote, data de fabricação e de validade e as condições de armazenamento e conservação.

7.15.1.2.4 Meios de cultura LJ comerciais

No Brasil, existem meios de cultura LJ comercialmente produzidos. É importante que o produto seja registrado no Ministério da Saúde e, no caso da aquisição, o fabricante deve apresentar documento da certificação de qualidade para a produção.

Para uso na rede de laboratórios de diagnóstico de tuberculose, recomenda-se que os mesmos sejam testados de acordo com o descrito neste capítulo. Para cada lote do meio adquirido, em cada tubo, deverá constar o nome do produto, número do lote, a data de fabricação e de validade e as condições de armazenamento e conservação.

7.15.1.2.5 Utilização e armazenamento do lote aprovado

A utilização do meio de cultura para uso em rotina de amostras clínicas deveria ser somente após a liberação do CQI, com aprovação. Entretanto, devido ao lento crescimento das micobactérias que requer aproximadamente um mês, e ao tempo de validade do meio preparado (2 meses), é prática aceita internacionalmente, a semeadura das amostras clínicas simultaneamente ao controle microbiológico do meio^{21,22}.

O laboratório deve registrar no “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade”, para cada amostra semeada, o número do lote do meio utilizado. Esta prática assegura que qualquer irregularidade encontrada no lote testado pelo controle de qualidade, possa servir para medidas corretivas na preparação dos próximos lote de meios.

Para contornar situações em que o lote de meio testado for reprovado e com isso haja perda de amostras clínicas, é indicada a utilização, em paralelo, de um lote de meio já conhecidamente testado e aprovado pelo CQI para a semeadura das amostras clínicas.

Portanto, o laboratório deve se organizar para ter na geladeira alguns tubos de meios do lote anterior já aprovado pelo CQI para semear em paralelo às amostras clínicas até ter a aprovação do novo lote que está sendo testado simultaneamente.

Os meios de cultura LJ e OK, quando armazenados dentro de sacos de plástico fechados para não desidratar, mantidos sob refrigeração (2-8°C) e ao abrigo da luz, têm validade de até 2 meses.

No item 7.17.4.1.7 deste capítulo está descrito o formulário que permite identificar individualmente os lotes de meios de cultura deficientes e descartá-los.

7.15.1.3 CQI dos reagentes

Para cada lote de produção ou de aquisição dos reagentes utilizados na etapa de fluidificação-descontaminação da cultura é importante monitorar a qualidade da preparação do reagente, a qualidade de uso do reagente e os resultados das culturas comparados às baciloskopias. As Planilhas do CQI dos reagentes estão descritas no item 7.17.2 deste capítulo.

Qualidade da preparação do reagente

1. Procedência (fabricante), número do lote do fabricante, data de validade.
2. Pesagem, pH, processo de esterilização em autoclave.

3. Depois de pronto e antes do uso, realizar o controle de esterilidade, semeando uma placa de agar sangue e incubando a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias. Para aprovação o lote não deverá apresentar crescimento de microrganismos.

Qualidade de uso diário

4. Aliquotar em volumes suficientes para um dia de trabalho e diariamente, antes do uso, comprovar que os reagentes apresentam as características macroscópicas de estabilidade e esterilidade.

Monitoramento das culturas

5. A observação dos resultados da baciloscopia e da cultura (escala de cruzes) também pode avaliar o lote do reagente de descontaminação, pois:
 - resultados de baciloscopia positiva e cultura positiva próximos de resultados de baciloscopia negativa e cultura negativa ou positiva: o lote do reagente está adequado e próprio para o uso.
 - resultado de baciloscopia negativa e cultura positiva confirmam a efetividade do reagente e do procedimento de descontaminação, porque a cultura é um método mais sensível que a baciloscopia.
 - resultados de baciloscopia positiva e cultura negativa indicam que o reagente utilizado está com nível de concentração mais alto do que o especificado e, portanto, impróprio para uso. Nesse caso, o lote do reagente está inadequado e não pode ser utilizado.

7.15.1.4 CQI do processamento das amostras

As recomendações e os formulários para o controle de qualidade do recebimento, coleta e transporte de amostras clínicas estão descritos no Capítulo 5. A seguir, estão as recomendações durante o processamento das amostras clínicas para a cultura²².

- Após o recebimento e o registro, mantê-las em ordem sistemática para a descontaminação, processando em primeiro lugar as amostras provenientes de sítios estéreis e depois delas, as amostras consideradas possíveis fontes de contaminação.
- O número de amostras a serem processadas deve ser capaz de assegurar tranquilidade e segurança para o profissional que está manipulando. É recomendável colocar as amostras que serão processadas naquele momento dentro de uma bandeja e então levá-las até a CSB.
- Durante a etapa de fluidificação-descontaminação controlar estritamente o tempo de contato entre o reagente e a amostra, de acordo com o método padronizado, pois um tempo demasiado curto resulta em aumento da taxa de contaminação e tempo demasiado longo resulta em perda da viabilidade do bacilo.

- Para evitar a transferência de bacilos de uma amostra para outra, recomenda-se utilizar os reagentes aliquotados em quantidades suficientes para um dia de trabalho. Não reutilizar os reagentes de um dia para o outro.
- Não abrir mais de um pote de amostra de cada vez assim como não tocar com a pipeta na borda dos tubos no momento da transferência do material.
- Fazer o descarte do sobrenadante com movimentos cautelosos para não respingar fora do frasco de descarte.
- Observar que não devem ser manipuladas num mesmo momento amostras clínicas para a descontaminação e os subcultivos. O laboratório deve se organizar de modo que esses procedimentos possam ser realizados em turnos diferentes ou em CSB separadas.
- Durante os procedimentos de subcultivo, que envolvem a preparação de suspensão líquida bacteriana, há a produção de aerossóis, os quais podem causar contaminação cruzada entre as culturas que estão sendo processadas simultaneamente. Para isso, observar o tempo de repouso da suspensão recomendada pela técnica.
- Verificar a velocidade alcançada pela centrifuga (3.000 x g), o tempo indicado pela técnica em uso e que a centrífuga seja refrigerada para não afetar a viabilidade dos bacilos. As condições de 3.000 x g por 15 minutos é a recomendada para se obter uma boa recuperação de micobactérias, que têm baixo peso específico.
- Verificar a temperatura da Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, que deve ser de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em que as flutuações não devem exceder $35\text{--}37^\circ\text{C}$. Os termômetros, no interior da estufa, devem estar em lugares facilmente visíveis e os registros diários devem ser monitorados.

7.15.1.5 CQI do sistema automatizado

Para o CQI dos sistemas automatizados de cultura e dos meios de cultura líquidos, devem-se seguir as recomendações do fabricante.

Quando se utilizam os equipamentos de leitura automatizada, realizar leitura diárias e manter os controles periódicos do equipamento leitor, de acordo com as instruções do fabricante.

Quanto ao índice de contaminação, quando se utiliza uma concentração menor de Hidróxido de sódio, essa porcentagem pode ser a 8 a 9% de contaminação aceitável.

7.15.1.6 Organização do trabalho e qualidade dos registros

É responsabilidade do laboratório disponibilizar um técnico que não esteja diretamente envolvido com a sementeira e leitura das culturas para verificar uma vez por semana, aleatoriamente, “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade”²². No item 7.17.4.3 estão descritos formulários para controle e monitoramento dos registros e resultados das culturas.

7.15.1.6.1 Registros das leituras

- Verificar se as culturas estão sendo revisadas sistematicamente: nas primeiras 48 horas para detectar e registrar uma possível contaminação e semanalmente para detectar o mais rápido possível a positividade.
- Em casos em que a temperatura exceder a 40°C, todos os resultados negativos para as culturas que estavam incubadas durante o ocorrido estão prejudicados. Se possível, solicitar novas amostras.
- Constatar que sejam solicitadas novas amostras para os casos em que foram consideradas irrecuperáveis por contaminação.
- Registrar os resultados de contaminação de cada tubo da cultura para que o monitoramento da eficácia do processo de fluidificação-descontaminação seja avaliado com o cálculo da porcentagem de contaminação.
- Verificar se as seguintes anotações estão presentes: data da leitura, características das colônias dos resultados positivos, culturas negativas, contaminação parcial e total da cultura (para cada tubo semeado), data da emissão do laudo.
- Se for possível, recomenda-se elaborar uma ficha individual para cada paciente que tenha resultado positivo em amostras semeadas para diagnóstico e a essa ficha serão adicionados todos os exames bacteriológicos realizados para esse paciente. Dessa maneira, é possível alimentar um banco de dados com essas informações, facilitando a detecção de possíveis problemas como: pacientes que sistematicamente apresentam baciloscopia positiva com cultura negativa; resultados que não se reproduzem. Além disso, permitirá calcular vários indicadores: contribuição da cultura no diagnóstico, porcentagem de micobacterioses, etc.

7.15.1.6.2 Monitoramento dos resultados

O monitoramento dos resultados é feito com controles diários e controles periódicos^{22,23}.

7.15.1.6.2.1 Controle diário dos resultados

Permite fazer correções de forma precoce, servem de sinal de alerta e devem ser investigados imediatamente.

Amostras com baciloscopia positiva e com cultura negativa

- Se a amostra foi coletada com o objetivo de controle de tratamento, o resultado pode refletir simplesmente que o paciente está eliminando bacilos inviáveis e que o tratamento está efetivo.
- Se a amostra foi coletada com o objetivo de diagnóstico, verificar se esse tipo de resultado se repete e investigar o controle microbiológico do lote de meios de cultura em uso, a concentração e o tempo de contato do reagente descontami-

nante ou a temperatura da Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e observar se não excedeu o limite aceitável.

Amostras contaminadas

- Se houve muito tempo entre a coleta e o processamento da cultura, corrigir o fluxo de rotina de trabalho do laboratório ou reorganizar o sistema de transporte de amostras.
- Se as contaminações se repetem em amostras do mesmo paciente, utilizar técnicas mais enérgicas de descontaminação.

Contaminações sistemáticas

Se várias contaminações ocorreram num mesmo dia com todas as amostras descontaminadas ou com todas as amostras provenientes de um mesmo lugar.

- Descartar os reagentes.
- Verificar os procedimentos técnicos de descontaminação.
- Observar se houve desvios das normas técnicas e se as correções técnicas foram feitas na ocasião em que essas foram detectadas.
- Organizar o transporte e a rotina de trabalho do laboratório no caso em que a demora no processamento seja consequência da demora desde a coleta.
- Treinar o profissional que tenha sido identificado como o responsável pelo processamento das amostras que contaminaram.

Contaminação cruzada

A ocorrência de uma concentração de culturas positivas em sequência num curto período de tempo é um sinal de alerta para a investigação de uma possível situação de contaminação cruzada entre as culturas realizadas.

Um resultado falso-positivo pode ocorrer e ser registrado como tal quando uma amostra foi contaminada antes ou durante o processamento do exame por outros organismos álcool-ácido resistentes não originárias do paciente ou quando os registros do paciente ou os resultados de seus exames foram registrados de forma incorreta.

Uma cultura falso-positiva significa que o resultado de uma amostra proveniente de um paciente é declarado positivo para uma espécie de micobactéria, quando, na realidade, o paciente não tem doença por essa determinada micobactéria.

É preciso examinar com atenção alguns sinais típicos de que falso-positivos estão ocorrendo.

- Um aumento repentino no número de isolamentos de um determinado microrganismo.
- Não correlação entre os isolamentos e sinais clínicos da doença.

- Uma discrepância entre os resultados da baciloscopia e os resultados da cultura.
- O aparecimento de um grupo de positivos, quando uma amostra se torna positiva e alguns dias depois uma sequência de amostras se tornam positivas.
- Quando uma ou várias amostras envolvidas no episódio resultaram em culturas com crescimento de raras colônias (menos de 10 colônias) e se foram processadas imediatamente depois de uma amostra com baciloscopia positiva.

Quando estas situações ocorrem, verificar se:

- se os pacientes envolvidos nesse grupo de culturas positivas têm dados clínicos compatíveis com tuberculose.
- se outras amostras do mesmo paciente também tiveram resultado positivo.

Havendo confirmação de algum desses sinais é preciso procurar estratégias para eliminar ou modificar esses casos de falso-positivos. A transferência de bacilos pode ter sido a partir de uma amostra com alta carga bacilar ou ser feita através dos reagentes utilizados durante o processo de descontaminação. Para tanto, verificar se:

- se os reagentes utilizados no processamento das amostras estão sendo aliquotados para uso diário.
- se está sendo obedecida a ordem sistemática de processar em primeiro lugar amostras de sítios estéreis e por último as amostras com alta carga bacilar.
- se o tempo de repouso que os tubos devem ser deixados ao sair da centrífuga está sendo respeitado.
- se o descarte do líquido sobrenadante está sendo feito com cuidado e suavidade.

Diante da suspeita de contaminação cruzada, se possível, encaminhar as culturas envolvidas nesse episódio a um laboratório de referência para genotipagem.

7.15.1.6.2.2 Controle periódico dos resultados

Depende da carga de trabalho e da incidência de casos de bacteriologia positiva, onde uma análise mensal, trimestral ou semestral dos registros do laboratório permite detectar erros sistemáticos mantidos no tempo.

Qualidade da cultura

De maneira geral, a cultura tem o propósito de aumentar a sensibilidade do diagnóstico ou realizar o teste de sensibilidade. Devido à sua maior sensibilidade comparada com a da baciloscopia, espera-se que a cultura contribua em certa proporção ao diagnóstico dos casos de TB pulmonar entre os pacientes sintomáticos respiratórios que têm resultados repetidamente negativos na baciloscopia. Na maioria dos países, esse tipo de paciente de TB pulmonar constitui aproximadamente 20% de todos os casos de TB confirmados bacteriologicamente.

O laboratório precisa conhecer a classificação de todos os casos de pacientes adultos pulmonares que foram diagnosticados, num período de tempo (normalmente este monitoramento é anual). Para que tenhamos condições de classificar os casos diagnosticados pelo laboratório nas categorias abaixo mencionadas, é preciso que as informações estejam contidas na requisição do exame, descritas no Capítulo 1. A seguir, estão as categorias:

- (a) Baciloscopia Positiva e Cultura Positiva.
- (b) Baciloscopia Positiva e Cultura Não Realizada.
- (c) Baciloscopia Negativa e Cultura Positiva.
- (d) Baciloscopia Positiva e Cultura Negativa.
- (e) Baciloscopia Positiva e Cultura Contaminada.

Cada uma das categorias tem seu significado:

(a) + (b): esses dois grupos juntos devem concentrar o maior número de casos. Estima-se que, numa situação epidemiológica real, 80% dos casos com diagnóstico confirmado bacteriológicamente devem ser diagnosticados pela baciloscopia.

(c): esse grupo deve contribuir com aproximadamente 20% do total de casos diagnosticados bacteriológicamente. Em países ou áreas onde as amostras são sistematicamente cultivadas para todos os sintomáticos respiratórios, a cultura pode contribuir com cerca de 30 a 40% do diagnóstico. Geralmente baixos valores se devem a solicitações inadequadas de cultura, solicitações de culturas de casos que não justificam essa ação ou deficiências técnicas, que reduzem a sensibilidade desse método.

(d): esse grupo deve ser muito baixo em amostras para diagnóstico pulmonar, porque a cultura de casos de baciloscopia positiva o resultado esperado é uma cultura positiva. Em casos excepcionais, encontram-se pacientes cujas baciloscopias de diagnóstico são sistematicamente positivas e suas culturas são negativas. Em geral se trata de amostras de controle de tratamento. Valores acima de 2 a 3% das baciloscopias positivas e culturas negativas geralmente indicam problemas técnicos no laboratório que reduzem ou eliminam a viabilidade do bacilo. Isso pode acontecer em decorrência de procedimentos drásticos de descontaminação, do caso de meios de cultura com baixa sensibilidade ou estufas com temperatura altas demais ou oscilantes. Também amostras mal conservadas ou resultados falso-positivos da baciloscopia podem contribuir para esses resultados de culturas falso-negativas.

(e): esse grupo deve ser muito baixo, cerca de 1%. Valores altos indicam problemas técnicos no laboratório.

A partir dessas informações é possível calcular indicadores que auxiliam o monitoramento periódico dos resultados da cultura:

Cálculo da contribuição da cultura ao diagnóstico:

$$\text{Contribuição da cultura ao diagnóstico} = \frac{(c)}{(a) + (b) + (c) + (d) + (e)} \times 100$$

Cálculo da percentagem de casos de baciloscopia positiva e cultura negativa:

$$\text{Porcentagem de casos de baciloscopia positiva e cultura negativa} = \frac{(d)}{(a) + (b) + (c) + (d) + (e)} \times 100$$

Relação entre os resultados da baciloscopia e da cultura

Tanto a baciloscopia como a cultura têm seus resultados expressos em escala de cruzes para o grau de positividade. Sendo a cultura mais sensível que a baciloscopia, normalmente amostras de diagnóstico com resultado de baciloscopia positiva deve ter resultado de cultura positiva e o grau de positividade da cultura deve ser igual ou maior do que a da baciloscopia.

Quando ocorrem mais de 3% de amostras com resultado de cultura com grau de positividade menor do que a da baciloscopia, estas devem ser investigadas.

Índice de contaminação

É calculado mensalmente como a percentagem de tubos contaminados entre o total de tubos semeados, a partir das informações do “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade”. A margem aceitável é de 3 a 5%.

Valores mais baixos podem indicar uma descontaminação excessivamente drástica, uma exposição muito longa da amostra à descontaminação ou uma concentração muito alta de verde de malaquita no meio de cultura.

Valores mais altos podem indicar concentração muito baixa do reagente descontaminante, tempo curto de contato entre a amostra e a solução descontaminante, amostras mal conservadas durante o transporte ou o armazenamento, tempo muito longo entre a coleta da amostra e seu processamento, problemas na preparação do meio de cultura (solução salina não estéril, autoclave que não atinge a temperatura necessária, etc.) ou a presença de contaminantes no ambiente do laboratório e/ou na estufa de cultura (geralmente fungos ambientais).

7.15.1.6.2.3 Monitoramento do tempo de entrega dos resultados

- Considerando que o laboratório utilize as metodologia clássicas ou convencionais para cultura e identificação, a maioria dos resultados (95%) deve sair dentro de 62 dias. Se utilizar sistemas de leitura automatizados o prazo é em torno de 30 dias.
- Verificar se a partir do momento em que foi detectada a positividade da cultura o resultado tenha sido informado em até 48 horas.

- Confirmar se os laudos de resultados estão sendo recebidos pelo solicitante do exame (local em que o paciente foi atendido e vai buscar o resultado) e em que prazo isto está acontecendo (tempo entre a digitação do laudo até o recebimento pelo solicitante).
- Em caso de haver demora entre a saída do resultado do laboratório e o recebimento, viabilizar outra maneira de enviá-los (fax, correio eletrônico ou outra maneira).
- Observar em que momento está ocorrendo demora: leitura das culturas, registro dos resultados, digitação dos laudos, envio dos laudos. Reorganizar o fluxo para agilizar esta situação.

7.15.2 Controle de qualidade externo

Como o Brasil tem uma grande área geográfica, a rede de laboratórios está estabelecida e muitos laboratórios (LRR, LRE/LACEN, alguns LRM e alguns laboratórios conveniados do SUS) realizam cultura, o LRN deve manter um programa de controle de qualidade externo dos isolados bacterianos, meios de cultura e reagentes produzidos por essa rede. Como o número de laboratórios é grande o LRN pode elaborar e executar esse programa em conjunto com os LRR.

Desse programa deve fazer parte o envio para o LRN de isolados bacterianos e amostras dos lotes produtos da rede, bem como do envio de painéis elaborados pelo LRN aos laboratórios participantes para análise frente a padrões estabelecidos, de acordo com a literatura internacional.

Após análise dos resultados, cada laboratório participante deve ser informado dessa avaliação. No caso de serem observados resultados imprecisos, deverá ser identificada a causa da imprecisão, assim como sugestões para reverter essa situação. Como consequência pode ser oferecido treinamento, se for o caso e é enviado novo painel ao laboratório, desenhado especialmente de acordo com o problema detectado.

É importante manter todos os registros de monitoramento da precisão alcançada pelos laboratórios em sucessivos controles.

O LRN deve estabelecer, também em parceria com os LRR, um comitê técnico, para o qual sejam convidados, também, os Centros Colaboradores – CC e haja uma combinação de conhecimentos teórico-práticos na análise dos dados produzidos por esse programa visando aperfeiçoar os serviços prestados.

7.16 Referências

- 1 RIEDER, H.L.; VAN DEUN, A.; KAM, K.M.; KIM, S.J.; CHOND, T.M, TRÉBUCQ, A. and URBANCZIK, R. *Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries*. Second edition. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Paris, France. 2007.
- 2 WHO/World Health Organization. *Toman's Tuberculosis. Case detection, treatment, and monitoring*. Questions and answers. 2nd edition. Edited by T. Frieden. WHO/HTM/TB2004.334. Geneva, Switzerland. 2004.
- 3 WHO/World Health Organization. IUATLD/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Brasil/Ministério da Saúde. Gerencia de Rede de Laboratórios de Tuberculose. 2^a ed. Atualizada. Série D. Reuniões e Conferências. Brasília – DF, Brasil, 192 p. 2004.
- 4 BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Tuberculose. Guia de Vigilância Epidemiológica*. 1^a Edição. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde (Ascom), Brasília, 100p. 2002.
- 5 SBPT/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: *Diretrizes Brasileiras para Tuberculose*. J Bras Pneumol, 30(Supl1): S1-S56, 2004.
- 6 SES-SP/Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. CVE/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Tuberculose. *Manual de orientação para coleta de amostras de escarro e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose*. São Paulo, 26p. 2002.
- 7 DAVID H.; BRUM, L.; PRIETO, E. *Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa, 1994.
- 8 WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part III. Culture*. WHO/TB/98.258. Geneva, Switzerland. 1998.
- 9 WHO. World Health Organization. *Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis*. (WHO/TB/2003.320). Geneva, Switzerland, 2003
- 10 BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Procedimentos de Bacteriologia da Tuberculose*. Protocolo do II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em Tuberculose no Brasil, 2005.
- 11 COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M. and YATES, M.D. *Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice*, 2nd edition ed. Butterworth-Heinemann, Oxford. 1997.
- 12 KENT, P.T. and KUBICA, G.P. Public Health Mycobacteriology. *A guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control, Atlanta, USA. 1985.
- 13 PFYFFER, G.E.; BROWN-ELLIOT, B.A.; and WALLACE, Jr. R.J. *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures*. Chapter 36, p.532-559. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenen (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. ASM Press, Washington, D.C. USA. 2003.

- 14 SEIC/Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005. *Procedimientos em Microbiología Clínica. Micobactérias. Parte 9ª*. Disponível em (<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>). Acesso em 25 Set 2005.
- 15 AMCI/Associazione dei Microbiologi Clinic Italiani. Centro di Referimento della Regione Toscana per i Micobatteri. 1998. *Quaderni di Microbiologia Clínica N. 7: Manuale di Micobatteriologia*. Disponível em <http://www.ao-careggi.toscana.it/microbiologia/CRRM/Testi/MICOBACTT.pdf>. Acesso em 25 Set 2005.
- 16 KUDOH, S. & KUDOH, T. *A simple technique for culturing tubercle bacilli*. Bulletin of the World Health Organization, 51:71-82. 1974.
- 17 SUSEMIHL, M.A.A.M.M.; FERRAZOLI, L.; UEKI, S.Y.M.; GIMENEZ, R.D.; PALACI, M. *Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias*. Rev Brasileira Patologia Clínica, 29(2):51-54. 1993.
- 18 SIDDIQI, S.H.; RÜSCH-GERDES, S. MGIT™ Procedure Manual for Bactec™ MGIT™ TB System. Mycobacteria Growth Indicator Tube Culture and Drug Susceptibility Demonstration Project. Prepared for The Foundation for Innovation New Diagnostics, 2006. Disponível em (<http://www.finddiagnostics.org>). Acesso em 04 Jul. 2007
- 19 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 3ª edição comemorativa, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- 20 INS/Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia. Laboratorio de Micobactérias. *Bacteriología del Mycobacterium tuberculosis y de Micobactérias no Tuberculosas*. Manual de Procedimientos. Bogotá, Colômbia. 2001.
- 21 The Australian Society for Microbiology. *Guidelines for Assuring Quality of Solid Media used in Australia for the Cultivation of Medically Important Mycobacteria*. Disponível em: (<http://www.theasm.com.au/>). Acesso em 03 Março 2007.
- 22 OPAS/Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guías Técnica. Parte II – Cultivo, 107 p., 2008.
- 23 Center for Disease Control and Prevention (CDC). Association of State and Territorial. Public Health Laboratory Directors. Recognition and Prevention of False-Positive Test Results in Mycobacteriology. A Laboratory Training Program. 1997.

7.17 Anexos do capítulo

7.17.1 Preparação de meios de cultura

Nesse item estão descritas as fórmulas e as informações para a preparação dos meios de cultura. Os respectivos formulários para o controle das preparações estão descritas no item 7.17.4.1.

7.17.1.1 Quadro 5 – Preparação dos Meios Sólidos LJ ou OK

Preparação dos Meios Sólidos LJ ou OK		
(a) Solução de sais minerais – meio base	LJ	OK
Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4)	2,4 g	12,0 g
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,24 g	-
Citrato de Magnésio	0,6 g	0,6 g
Glutamato de Sódio	-	3,0 g
Asparagina	3,6 g	-
Glicerol	12 ml	24 ml
Água destilada	600 ml	600 ml
1. Dissolver os ingredientes, em ordem, em Água destilada aquecida. 2. Autoclavar a 121°C por 30 minutos para esterilizar. 3. Esfriar a temperatura ambiente. Esta solução pode ser mantida sob refrigeração. 4. No caso do meio LJ, se usar meio base desidratado comercial de qualidade, preparar de acordo com o fabricante, acrescentando o glicerol.		
(b) Solução Verde malaquita	LJ	OK
Verde malaquita (pó)	2 g	2 g
Água destilada estéril	100 ml	100 ml
5. Usando técnicas assépticas dissolver o corante na Água destilada estéril. 6. Colocar na Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 a 2 horas para melhor dissolução. 7. Preparar esta solução no momento do uso;		
(c) Homogeneizado de ovos	LJ	OK
8. Usar ovos de galinhas não alimentadas com antibióticos, recém-colhidos (com menos de 7 dias). 9. Limpar os ovos com escova, água morna e sabão alcalino e deixar de molho na água com sabão por 30 minutos. 10. Após, enxaguar com água corrente, deixar de molho na Solução de Álcool a 70% por 15 minutos. Retirar e secar com pano estéril. 11. Antes de quebrar os ovos, lave bem as mãos. Quebre os ovos, um a um, separadamente, num recipiente estéril para observar a qualidade dos mesmos e colocar no copo do liquidificador estéril para homogeneizar. 12. Filtrar o homogeneizado através de gaze estéril num funil, para um frasco de vidro graduado estéril. A quantidade de ovos para preparar 1000 ml, depende do tamanho destes, aproximadamente 20 a 25 ovos.		

(d) Preparação do meio completo	LJ	OK
Solução de sais minerais (a)	600 ml	600 ml
Solução Verde malaquita 2% (b)	20 ml	20 ml
Homogeneizado de ovos (c) qsp	1000 ml	1000 ml
13. Adicionar (b) solução de verde malaquita ao (a) meio base. 14. Após, adicionar o (c) homogeneizado de ovos. 15. Manter o meio homogêneo, sob agitação periódica, durante sua distribuição nos tubos. A agitação deve ser suave para evitar a formação de bolhas de ar. 16. Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. 17. Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C. 18. Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C.		
Validade: 2 meses sob refrigeração		

7.17.1.2 Quadro 6 – Preparação dos Meios Sólidos LJ ou OK com Piruvato de Sódio

Preparação dos Meios Sólidos LJ ou OK com Piruvato de Sódio		
(e) Solução de sais minerais – meio base com piruvato	LJ	OK
Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4)	2,4 g	12 g
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,24 g	-
Citrato de Magnésio	0,6 g	0,6 g
Glutamato de Sódio	-	3 g
Asparagina	3,6 g	-
Piruvato de sódio	7,2 g	7,2 g
Água destilada	600 ml	600 ml
1. Dissolver os ingredientes, em ordem, em Água destilada aquecida. 2. Autoclavar a 121°C por 30 minutos para esterilizar. 3. Esfriar a temperatura ambiente. Esta solução pode ser mantida sob refrigeração. 4. No caso do meio LJ, havendo possibilidade, usar meio base desidratado comercial, de qualidade, e prepará-lo de acordo com o fabricante, acrescentando piruvato de sódio;		
As demais etapas da preparação do meio completo seguem como já descritas em (b), (c) e (d) do item 7.17.1.1		
Validade: 2 meses sob refrigeração		

7.17.1.3 Quadro 7 – Preparação de Meio Sólido LJ com Citrato Férrico Amoniacal

Preparação de Meio Sólido LJ com Citrato Férrico Amoniacal 2,5%	
Citrato férrico amoniacal	5 g
Meio completo LJ – preparado em (d) do item 7.17.1.1	200 ml
1. Pesar o citrato férrico amoniacal. 2. Adicionar em 200 ml do meio LJ completo. 3. Manter o meio homogêneo, sob agitação periódica, durante sua distribuição nos tubos. A agitação deve ser suave para evitar a formação de bolhas de ar. 4. Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. 5. Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados no coagulador a 80-85°C por 45 minutos. 6. Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C.	
Validade: 2 meses sob refrigeração	

7.17.1.4 Quadro 8 – Preparação de Meio Sólido LJ com PNB

Preparação dos Meios Sólidos LJ ou OK com PNB 500 µg/ml	
(f) Preparação da Solução A (PNB + Propilenoglicol)	
Ácido p-nitrobenzóico (PNB)	0,2 g
Propilenoglicol	10 ml
1. Pesar o PNB. 2. Dissolver em propilenoglicol. 3. Autoclavar 121°C por 10 minutos ou filtrar em filtro Millipore 0,20 µ.	
(g) Preparação da Solução B (PNB + Hidróxido de sódio)	
Ácido p-nitrobenzóico (PNB)	2,5 g
NaOH 1N	15 ml
Água destilada estéril	80 ml
1. Dissolver o PNB em 15 ml de NaOH. 2. Completar com Água destilada até 80 ml.	
3. Adicionar Fenolftaleína alcoólica 0,1% (solução em etanol)	1-2 gts
4. Adicionar gotas (cerca de 3 ml) de HCl 1N mexendo constantemente até a viragem da cor (incolor). 5. Se houver formação de um precipitado branco (excesso de ácido) adicionar gotas de NaOH 1N.	
6. Adicionar Água destilada estéril qsp	100 ml
(h) Preparação do meio com PNB	
1. Adicionar 5 ml da solução de PNB preparada em (f) ou (g) em 200 ml do meio completo LJ ou OK preparado em (d). 2. Manter o meio homogêneo, sob agitação periódica, durante sua distribuição nos tubos. A agitação deve ser suave para evitar a formação de bolhas de ar. 3. Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. 4. Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados no coagulador a 80-85°C por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C.	
Validade: 2 meses sob refrigeração	

7.17.1.5 Quadro 9 – Preparação de Meio de Agar Sangue

Preparação de Meio de Agar Sangue	
Base Mueller-Hinton	de acordo com o fabricante
Água destilada qsp	100 ml
Sangue desfibrinado de carneiro	5 ml
1. Dissolver a base de Mueller-Hinton em Água destilada. 2. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Esperar esfriar até 45-50°C. 3. Adicionar o sangue de carneiro e distribuir em placas ou tubos com tampa de rosca.	

7.17.2 Preparação de Reagentes

Nesse item, estão descritas as fórmulas e as informações para a preparação dos reagentes para a realização das culturas. Os respectivos formulários para o controle das preparações estão descritas no item 7.17.4.2.

7.17.2.1 Quadro 10 – Preparação da Solução de Hidróxido de Sódio

Preparação da Solução de Hidróxido de sódio 4%	
Hidróxido de sódio (NaOH)	4,0 g
Água destilada	100 ml
1. Dissolver o Hidróxido de sódio na Água destilada. 2. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

7.17.2.2 Quadro 11 – Preparação da Solução de Vermelho de Fenol 0,4% – Método de Petroff

Preparação da Solução de Vermelho de Fenol 0,4% – Método Petroff	
Vermelho de fenol (pó)	0,4 g
Solução Hidróxido de sódio 4%	100 ml
1. Dissolver o Vermelho de fenol na Solução de Hidróxido de sódio 4%. 2. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

7.17.2.3 Quadro 12 – Preparação da Solução Neutralizante- Método de Petroff

Preparação da Solução Neutralizante – Método Petroff	
Ácido clorídrico (HCl) concentrado 37%	8,5 ml
Solução de Vermelho de fenol 0,4%.	1 ml
Água destilada qsp	100 ml
1. Adicionar 8,5 ml de Ácido clorídrico a aproximadamente 80 ml de água; Acrescentar 1 ml de Solução de Vermelho de fenol. 2. Completar o volume para 100 ml com Água destilada. 3. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

7.17.2.4 Quadro 13 – Preparação da Solução de Citrato de Sódio 2,9%- Método NALC-NaOH

Preparação da Solução de Citrato de Sódio 2,9% – Método NALC-NaOH	
Citrato de sódio bi-hidratado	2,9 g
Água destilada	100 ml
1. Dissolver o Citrato de sódio na Água destilada. 2. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Observação: Se o Citrato de sódio for anidro, pesar 2,6 g.	

7.17.2.5 Quadro 14 – Preparação da Solução Depurante – Método NALC-NaOH

Preparação da Solução Depurante – Método NALC-NaOH			
Volume de Solução Depurante necessária **	Mistura NaOH–Citrato de sódio ***		Quantidade de NALC a ser adicionada ****
	NaOH 4%	Citrato de sódio 2,9%	
50 ml	25 ml	25 ml	0,25 g
100 ml	50 ml	50 ml	0,5 g
200 ml	100 ml	100 ml	1 g
500 ml	250 ml	250 ml	2,5 g
1000 ml	500 ml	500 ml	5 g
** Preparar diariamente a solução de trabalho, calculando a quantidade necessária de acordo com a quantidade de amostras a serem processadas (v/v).			
*** A mistura de NaOH-Citrato de sódio pode ser preparada em frasco com tampa de rosca, esterilizada e guardada sob refrigeração.			
**** Após a adição de NALC, a Solução Depurante deverá ser usada em 24 horas porque o NALC perde a atividade mucolítica.			

Fonte: Kent P.T. and Kubica G.P. Public Health Mycobacteriology. A guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta, USA. 1985.

7.17.2.6 Quadro 15 – Preparação da Solução Tampão Fosfato pH 6,8 – Método NALC-NaOH

Preparação da Solução Tampão Fosfato pH 6,8 – Método NALC-NaOH	
(h) Preparação da Solução A	
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	9,47 g
Água destilada	1000 ml
1. Dissolver o fosfato dissódico em Água destilada	
(i) Preparação da Solução B	
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	9,07 g
Água destilada	1000 ml
2. Dissolver o fosfato monopotássico em Água destilada	
(j) Preparação da Solução Tampão Fosfato pH 6,8	
3. Misturar 50 ml de (Solução A) e 50 ml de (Solução B) e verificar o pH, que deverá ser 6,8.	
4. Se precisar ajustar o pH, use a solução (Solução A) para aumentar e a solução (Solução B) para diminuir.	
5. Autoclavar a 121°C por 15 minutos	

7.17.2.7 Quadro 16 – Preparação da Solução de Ácido Oxálico 5% – Descontaminante

Preparação da Solução de Ácido oxálico 5% – Descontaminante	
Ácido oxálico	5 g
Água destilada	100 ml
1. Dissolver o Ácido oxálico na Água destilada.	
2. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

7.17.2.8 Quadro 17 – Preparação da Solução Indicadora – Método Oxálico

Preparação da Solução Indicadora – Método Oxálico	
Vermelho de fenol (pó)	8 mg
Solução NaOH 4%	20 ml
Água destilada qsp	1000 ml
1. Dissolver o vermelho de fenol na Solução de NaOH.	
2. Acrescentar Água destilada qs para completar 1000 ml.	

7.17.2.9 Quadro 18 – Preparação do Tubo nº 1 da Escala McFarland

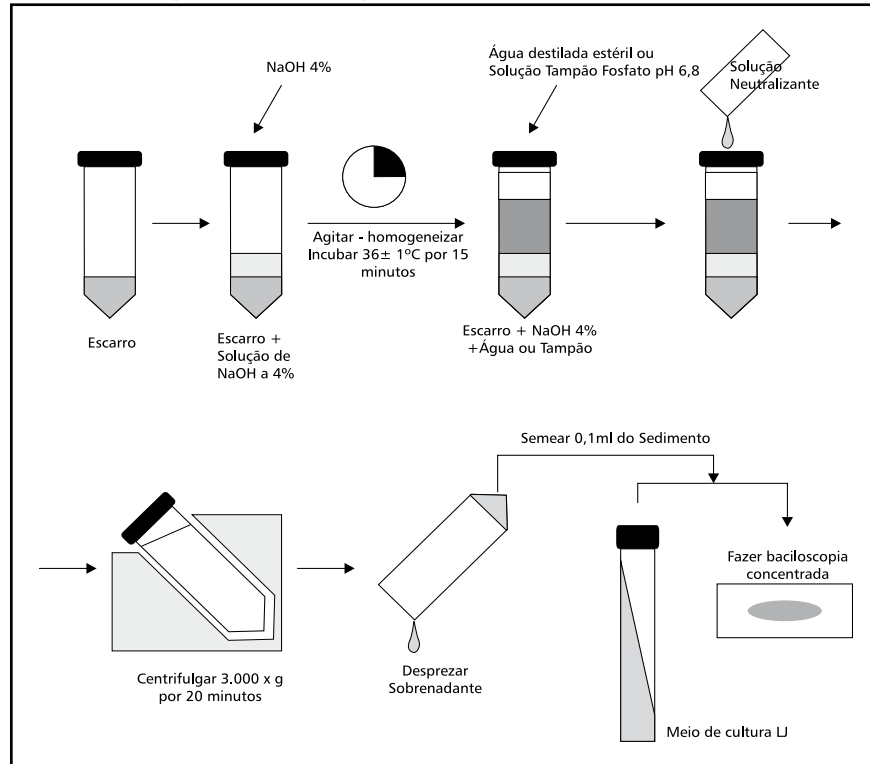
Preparação do Tubo nº 1 da Escala McFarland	
(k) Preparação da Solução de Cloreto de bário	
Cloreto de bário dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1,175 g
Água destilada qsp	100 ml
1. Dissolver o Cloreto de bário em Água destilada = Cloreto de bário 1%	
(l) Preparação da Solução de Ácido sulfúrico	
Ácido sulfúrico concentrado	1 ml
Água destilada	100 ml
2. Lentamente, adicionar o ácido sulfúrico na Água destilada = Ácido sulfúrico 1%.	
3. Guardar sob refrigeração (2-8°C).	
(m) Preparação do Tubo Nº 1 da Escala McFarland	
Solução de Cloreto de bário 1%	0,1 ml
Ácido sulfúrico 1%	9,9 ml
5. Adicionar v/v o Cloreto de bário e o Ácido sulfúrico.	
6. Acondicionar em tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca.	
7. Fechar bem o tubo (selar) e guardar ao abrigo da luz, à temperatura ambiente; Validade por um mês.	
8. Agitar vigorosamente antes do uso. Descartar se apresentar grumos ou depósitos de partículas.	
A escala McFarland é utilizada na padronização da turvação de suspensões de bactérias. O tubo Nº 1 corresponde a uma concentração bacteriana de 300 milhões por mililitro.	
Validade: 1 mês	

7.17.2.10 Quadro 19 – Preparação da Solução Salina 0,85%

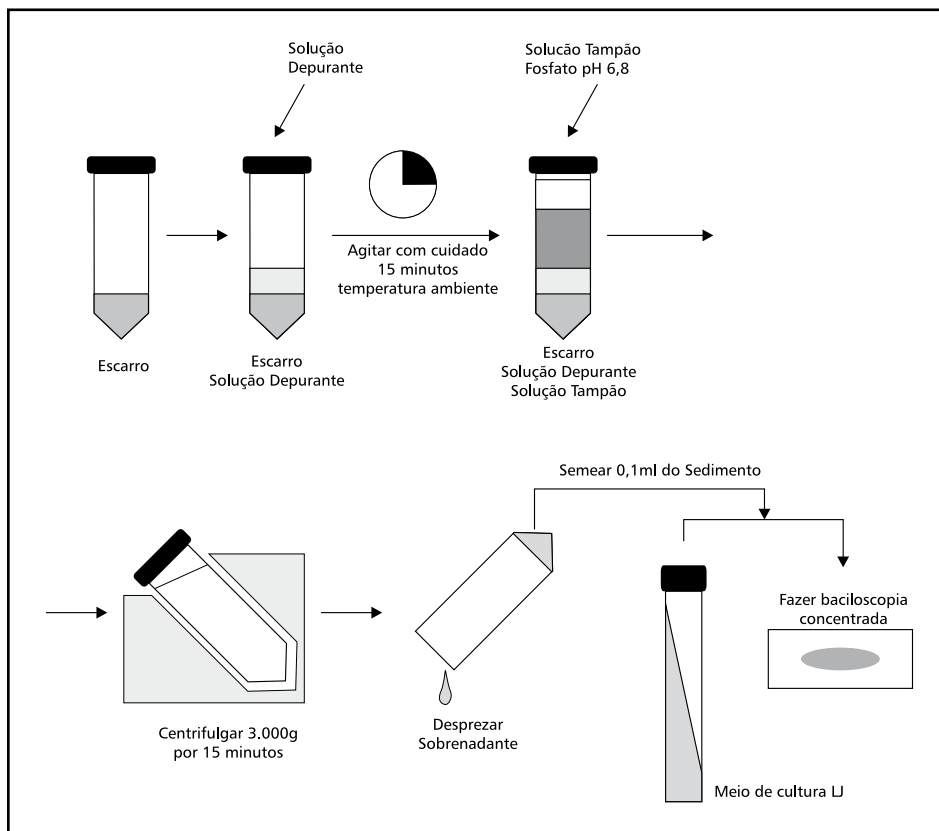
Preparação da Solução Salina 0,85%	
Cloreto de sódio (NaCl)	0,85 g
Água destilada	100 ml
1. Dissolver o Cloreto de sódio na Água destilada.	
2. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

7.17.3 Figuras e Fluxogramas

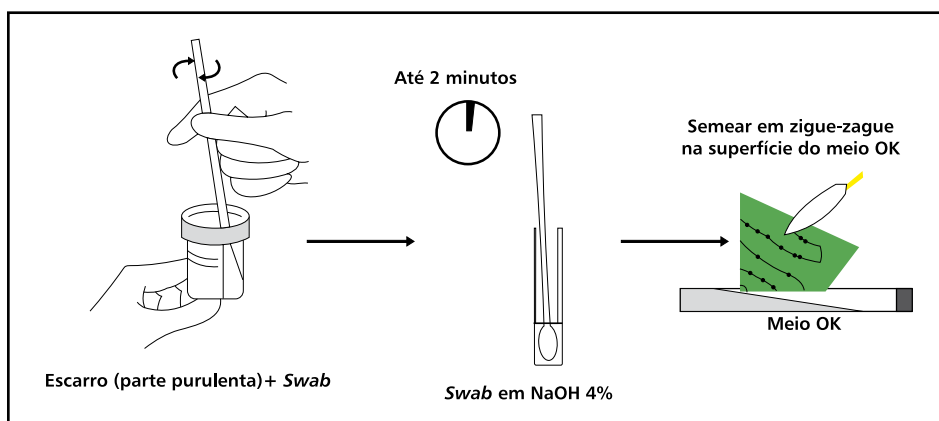
7.17.3.1 Figura 2 – Fluxograma do Método de Petroff Modificado



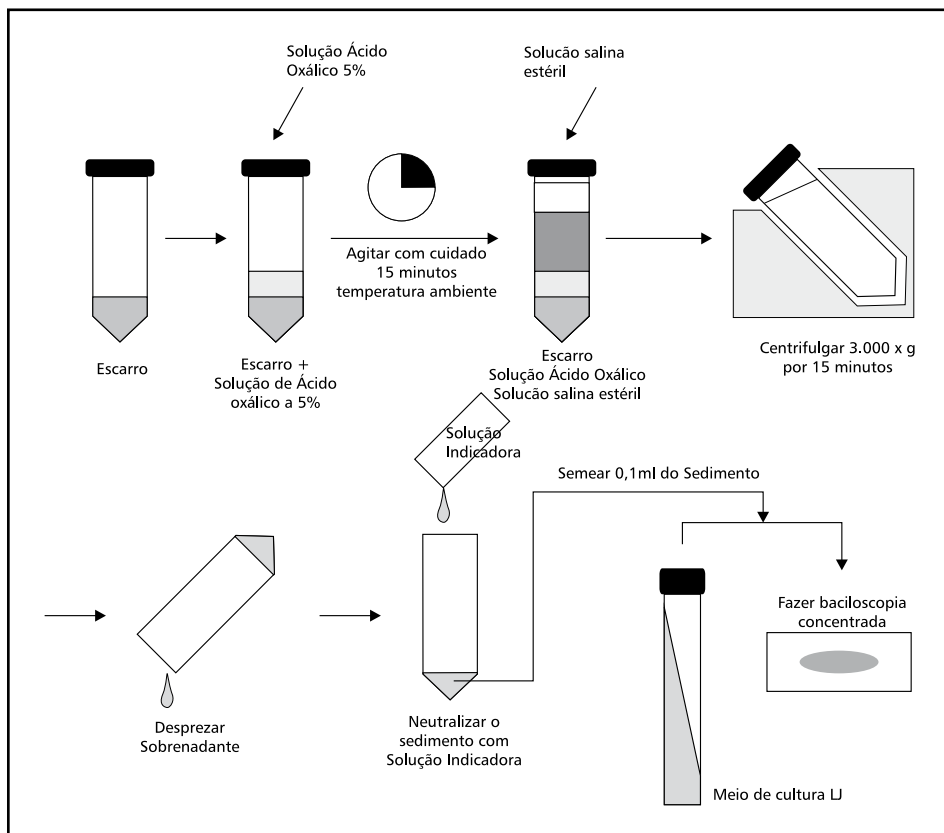
7.17.3.2 Figura 3 – Fluxograma do Método de NALC – NaOH



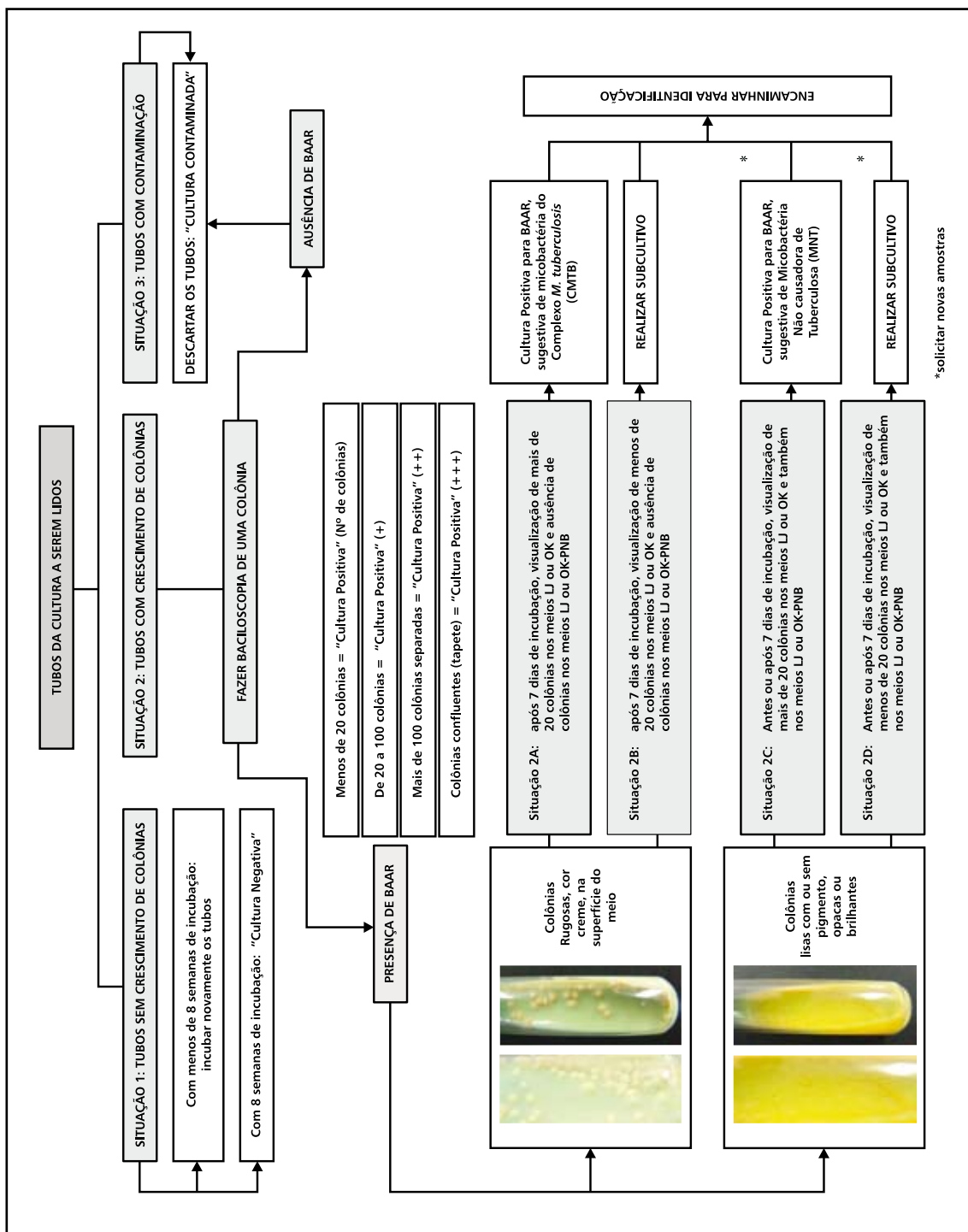
7.17.3.3 Figura 4 – Fluxograma do Método de Ogawa-Kudoh



7.17.3.4 Figura 5 – Fluxograma do Método do Ácido Oxálico



7.17.3.5 Figura 6 – Fluxograma de leitura das culturas em meio sólido



7.17.4 Formulários do CQI da cultura

7.17.4.1 Formulários do CQI dos Meios de Cultura

7.17.4.1.1 Formulário – Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK



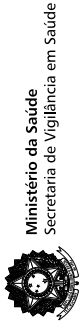
Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	☐ Meio LJ	☐ Meio OK	Nº Lote Produzido
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume
Fosfato Monopotássico					
Sulfato de Magnésio					
Citrato de Magnésio					
Glutamato de Sódio					
Asparagina					
Glicerol					
Verde Malaquita					
Ovos					
ou Meio Base LJ Comercial					
Água destilada					
Esterilização Autoclave - Solução Meio Base					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle ☐ Aprovado ☐ Reprovado	Responsável
Observações:					

Coagulação - Meio Completo (Meio Base + Ovos)						
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle	Responsável	
				☐ Aprovado ☐ Reprovado		
Aspectos Macroscópicos						
Cor	Consistência	Volume	Inclinação	Textura	Responsável	
☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP		
Observações:						Data:
AP = Aprovado = conforme esperado						REP = Reprovado = em desacordo com o esperado
Controle de Esterilidade - Incubação a 36 ± 1°C						
☐ Aprovado = Não Houve Crescimento de microrganismos						Responsável:
Observações:						
Controle Microbiológico - Cepa Referência:						
Tubo 10 ⁻³		Tubo 10 ⁻⁵				
média das UFC = _____ UFC		média das UFC = _____ UFC				
☐ Aprovado. Média das UFC no Tubo 10 ⁻⁵ = 50 a 150						Responsável:
Observações:						Data:

7.17.4.1.2 Formulário – Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK com Piruvato de Sódio

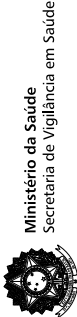


Formulário - Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK com Piruvato de Sódio

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	☐ Meio LJ - Piruvato	☐ Meio OK - Piruvato	Nº Lote Produzido
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume
Fosfato Monopotássico					
Sulfato de Magnésio					
Citrato de Magnésio					
Glutamato de Sódio					
Asparagina					
Piruvato de Sódio					
Verde Malaquita					
Ovos					
ou Meio Base LJ Comercial					
Água destilada					
Esterilização Autoclave - Solução Meio Base					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle ☐ Aprovado ☐ Reprovado	Responsável
Observações:					

Coagulação - Meio Completo (Meio Base + Ovos)						
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle	Responsável	
				☐ Aprovado ☐ Reprovado		
Aspectos Macroscópicos						
Cor	Consistência	Volume	Inclinação	Textura	Responsável	
☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP	☐ AP ☐ REP		
Observações:						Data:
AP = Aprovado = conforme esperado						REP = Reprovado = em desacordo com o esperado
Controle de Esterilidade - Incubação a 36 ± 1°C						
☐ Aprovado = Não Houve Crescimento de microrganismos						Responsável:
Observações:						
Controle Microbiológico - Cepa Referência:						
Tubo 10 ⁻³		Tubo 10 ⁻⁵				
média das UFC = _____ UFC		média das UFC = _____ UFC				
☐ Aprovado. Média das UFC no Tubo 10 ⁻⁵ = 50 a 150						Responsável:
Observações:						Data:

7.17.4.1.3 Formulário – Controle da Preparação de Meios de Cultura Sólido LJ com Citrato Férrico Amoniacal



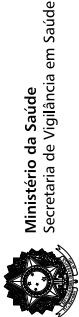
Formulário - Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ com Citrato Férrico Amoniacal

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade			Nº Lote Produzido
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume
Fosfato Monopotássico					
Sulfato de Magnésio					
Citrato de Magnésio					
Glutamato de Sódio					
Asparagina					
Piruvato de Sódio					
Verde Malaquita					
Ovos					
ou Meio Base LJ Comercial					
Água destilada					
Citrato Férrico Amoniacal					

Esterilização Autoclave - Solução Meio Base				
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle ☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável				
Observações:				

Coagulação - Meio Completo (Meio Base + Ovos)						
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle		Responsável
				☐ Aprovado	☐ Reprovado	
Aspectos Macroscópicos						
Cor	Consistência	Volume	Inclinação	Textura	Responsável	
☐ AP	☐ AP	☐ AP	☐ AP	☐ AP	☐ REP	
Observações:						
Data:						
AP = Aprovado = conforme esperado				REP = Reprovado = em desacordo com o esperado		
Controle de Esterilidade - Incubação a 36 ± 1°C						
☐ Aprovado = Não Houve Crescimento de microrganismos				☐ Reprovado = Houve Crescimento de microrganismos		
Observações:				Responsável:		
Controle Microbiológico - Cepa Referência:						
Tubo 10 ⁻³		Tubo 10 ⁻⁵				
média das UFC = _____ UFC		média das UFC = _____ UFC				
☐ Aprovado. Média das UFC no Tubo 10 ⁻³ = 50 a 150				☐ Reprovado. Média das UFC no Tubo 10 ⁻⁵ = inferior ao valor esperado		
Responsável:				Data:		

7.17.4.1.4 Formulário – Controle da Preparação da Solução de PNB para Adição em Meios Sólidos LJ ou OK



Formulário - Controle da Solução de PNB para Adição em Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK

☐ Solução A (PNB + Propilenoglicol)				☐ Solução B (PNB + Hidróxido de sódio)			
Observação: esta solução será adicionada na preparação do meio do formulário - Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK com PNB							
Data de Preparação		Quantidade Produzida		Nº Lote Produzido			
☐ Solução A (PNB + Propilenoglicol) ou							
Substância		Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume	
Ácido p-nitrobenzólico (PNB)							
Propilenoglicol							
Hidróxido de sódio							
Água destilada							
Esterilização Autoclave:							
☐ Solução A ou Equipamento		Temperatura	Tempo	☐ Solução B Data	Controle	Responsável	
					☐ Aprovado	☐ Reprovado	
Responsável e Data:							

7.17.4.1.5 Formulário – Controle da Preparação dos Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK com PNB



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Controle da Preparação de Meio de Cultura Sólido LJ ou OK com PNB

Data de Preparação		Validade	Quantidade Produzida	☐ LJ com PNB	☐ OK com PNB	Nº Lote Produzido
Preparação do Meio Base LJ ou OK com adição de PNB						
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume	
Fosfato Monopotássico						
Sulfato de Magnésio						
Citrato de Magnésio						
Glutamato de Sódio						
Asparagina						
Glicerol						
Verde Malaquita						
Ovos						
ou Meio Base LJ Comercial						
Água destilada						
Solução de PNB (A ou B)	Formulário-Controle da Solução de PNB para Adição em Meios de Cultura Sólidos LJ ou OK					
Esterilização Autoclave - Solução Meio Completo LJ ou OK com PNB						
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle ☐ Aprovado ☐ Reprovado	Responsável	
Observações:						

Coagulação - Meio Completo (Meio Base + Ovos)					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle ☐ Aprovado ☐ Reprovado	Responsável
Aspectos Macroscópicos					
Cor ☐ AP	Consistência ☐ AP	Volume ☐ AP	Inclinação ☐ AP	Textura ☐ AP	Responsável
Observações:					Data:
AP = Aprovado = conforme esperado			REP = Reprovado = em desacordo com o esperado		
Controle de Esterilidade - Incubação a 36 ± 1°C					
☐ Aprovado = Não Houve Crescimento de microrganismos			☐ Reprovado = Houve Crescimento de microrganismos		
Observações:			Responsável:		
Controle Microbiológico - Cepa Referência:					
Tubo 10 ⁻³ média das UFC = _____ UFC		Tubo 10 ⁻⁵ média das UFC = _____ UFC			
☐ Aprovado. Média das UFC no Tubo 10 ⁻³ = 50 a 150		☐ Reprovado. Média das UFC no Tubo 10 ⁻⁵ = inferior ao valor esperado			
Responsável:		Data:			

7.17.4.1.6 Formulário – Controle da Preparação do Meio de Agar Sangue



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Controle da Preparação
do Meio de Agar Sangue

Data de Preparação		Quantidade Produzida		Nº Lote Produzido	
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume
Blood Agar Base ou Mueller Hinton Media					
Sangue Desfibrinado de Carneiro					
Esterilização Autoclave					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle ☐ Aprovado ☐ Reprovado	Responsável
Responsável:				Data:	

Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Controle da Produção e Consumo de todos os Meios de Cultura utilizados no Laboratório

[illegible]

Interpretação - Providências

- Esta Formulário permite verificar individualmente os lotes de meios deficientes e descartá-los;

7.17.4.2 Formulários do CQI dos Reagentes

7.17.4.2.1 Formulário – Controle da Preparação da Solução de Hidróxido de sódio 4%



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

**Formulário – Controle da Preparação da
Solução de Hidróxido de Sódio a 4%**

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido		
Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade		
Hidróxido de sódio					
Água destilada					
Pesagem (g) / volume (ml)					
Substância		Quantidade			
Hidróxido de sódio					
Água destilada					
Pesagem Balança – Marca:					
Responsável:					
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:					
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado		
Responsável:			Data de Execução:		
Controle de Esterilidade					
Semeadura em ágar sangue		Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias			
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos		☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos			
Responsável:			Data de Execução:		

7.17.4.2.2 Formulário – Controle da Preparação da Solução de Vermelho de Fenol a 0,4% – Método Petroff



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução de Vermelho de Fenol a 0,4% – Método Petroff

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Vermelho de fenol			
Água destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Vermelho de fenol			
Água destilada			
Pesagem Balança – Marca:			
Responsável:			
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			Data de Execução:

Controle de Esterilidade	
Semeadura em ágar sangue	Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos	☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos
Responsável:	
Data de Execução:	

7.17.4.2.3 Formulário – Controle da Preparação da Solução Neutralizante – Método Petroff



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução Neutralizante – Método Petroff

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Ácido clorídrico concentrado			
Solução de Vermelho de fenol a 0,4%			
Água destilada estéril			

Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Ácido clorídrico concentrado			
Vermelho de fenol			
Água destilada			
Pesagem Balança – Marca:			
Responsável:			
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			Data de Execução:

Controle de Esterilidade	
Semeadura em ágar sangue	Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos	☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos
Responsável:	
Data de Execução:	

7.17.4.2.4 Formulário – Controle da Preparação da Solução Citrato de Sódio 2,9% – Método NALC-NaOH



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução Citrato de Sódio 2,9% – Método NALC-NaOH

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Citrato de sódio			
Água destilada estéril			

Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Citrato de sódio			
Água destilada			
Pesagem Balança – Marca:			
Responsável:			
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			Data de Execução:

Controle de Esterilidade	
Semeadura em ágar sangue	Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos	☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos
Responsável:	
Data de Execução:	

7.17.4.2.5 Formulário – Controle da Preparação da Solução Depurante – Método NALC-NaOH



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução Depurante – Método NALC-NaOH

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância/Solução	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
NALC			
Solução Citrato de sódio 2,9%			
Solução Hidróxido de sódio 4%			

Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância/Solução		Quantidade	
NALC			
Solução Citrato de sódio 2,9%			
Solução Hidróxido de sódio 4%			
Pesagem Balança – Marca:			
Responsável:			
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			Data de Execução:

Controle de Esterilidade	
Semeadura em ágar sangue	Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos	☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos
Responsável:	Data de Execução:

7.17.4.2.6 Formulário – Controle da Preparação da Solução Tampão Fosfato pH 6,8 – Método NALC-NaOH



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução Tampão Fosfato pH 6,8 – Método NALC-NaOH

Data de Preparação		Quantidade Produzida		Validade		Nº do Lote Produzido	
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote do Fabricante	Validade	Observações		
Fosfato de Sódio M/15							
Fosfato de Potássio M/15							
Solução A	Fórmula	Pesagem / volume	Data de Produção	Nº Lote de Produção	Validade		
Fosfato de Sódio M/15							
Água Destilada							
Solução B	Fórmula	Pesagem / volume	Data de Produção	Nº Lote de Produção	Validade		
Fosfato de Potássio M/15							
Água Destilada							
Esterilização Autoclave – Soluções A e B							
Equipamento:		Temperatura:		Tempo:		☐ Aprovado ☐ Reprovado	
Responsável				Data:			
Preparação da Solução Tampão Fosfato pH 6,8							
Solução	Volume (ml)	Data Produção	Nº Lote de Produção	Validade	CQ		
Solução Fosfato de Sódio (A)							
Solução Fosfato de Potássio (B)							
Controle de Esterilidade – Solução Tampão Fosfato pH 6,8							
Semeadura em Agar Sangue /Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias							
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos				☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos			
Responsável				data:			

7.17.4.2.7 Formulário – Controle da Preparação da Solução de Ácido Oxálico 5% – Descontaminante



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução de Ácido oxálico 5% – Descontaminante

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido
Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Ácido oxálico			
Água destilada estéril			
Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Ácido oxálico			
Água destilada			
Pesagem Balança – Marca:			
Responsável:			Data de Execução:
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			
Controle de Esterilidade			
Semeadura em ágar sangue		Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias	
☐ Aprovado, Não houve crescimento de microrganismos		☐ Reprovado, Houve crescimento de microrganismos	
Responsável:			Data de Execução:

7.17.4.2.8 Formulário – Controle da Preparação da Solução Indicadora – Método Ácido Oxálico



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução Indicadora – Método Ácido Oxálico

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância/Solução	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Vermelho de fenol			
Solução Hidróxido de sódio 4%			
Água destilada			

Pesagem (g) / volume (ml)			
Substância/Solução		Quantidade	
Vermelho de fenol			
Solução Hidróxido de sódio 4%			
Água destilada			
Pesagem Balança – Marca:			
Responsável:			
Esterilização Autoclave – Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			Data de Execução:

Controle de Esterilidade	
Semeadura em ágar sangue	Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias
☐ Aprovado. Não houve crescimento de microrganismos	☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos
Responsável:	
Data de Execução:	

7.17.4.2.9 Formulário – Controle da Preparação do Tubo Nº 1 da Escala de McFarland



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação do Tubo nº 1 Escala McFarland

Data de Preparação		Quantidade Produzida		Validade		Nº do Lote Produzido	
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote do Fabricante		Validade	Observações	
Cloreto de Bário bi-hidratado	BaCl ₂ .2H ₂ O						
Ácido Sulfúrico concentrado	H ₂ SO ₄						
Preparação da Solução A							
Substância		Pesagem / volume		Nº Lote de Produção		Validade	
Cloreto de Bário							
Água Destilada							
Preparação da Solução B							
Substância		Pesagem / volume		Nº Lote de Produção		Validade	
Ácido Sulfúrico							
Água Destilada							
Preparação do Tubo Nº 1 da Escala McFarland							
Substância		Volume		Nº Lote de Produção		Validade	
Solução A							
Solução B							
Responsável					Data:		

7.17.4.2.10 Formulário – Controle da Preparação da Solução Salina 0,85%



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução Salina 0,85%

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido
Substância	Procedência	Nº Lote do Fabricante	Validade
Cloreto de sódio			
Pesagem (g) / Volume (ml)			
Substância		Quantidade	
Cloreto de Sódio			
Água Destilada			
Responsável			Data:
Esterilização Autoclave			
Equipamento:	Temperatura:	Tempo:	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável			Data:
Controle de Esterilidade			
Semeadura em meio Agar Sangue/ Incubação a 36 ± 1°C por 5 dias			
☐ Aprovado. Não houve crescimento microrganismos		☐ Reprovado. Houve crescimento de microrganismos	
Responsável			Data:

7.17.4.3 Formulários de Monitoramento dos Resultados

7.17.4.3.1 Formulário – Monitoramento dos Registros e Resultados das Culturas



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Monitoramento dos Registros e Resultados das Culturas

[illegible]

7.17.4.3.2 Formulário – Monitoramento da Contribuição da Cultura ao Diagnóstico



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Monitoramento da Contribuição da Cultura ao Diagnóstico

Ano / Período avaliado	Nº de Culturas realizadas no período
(A) Número de casos com Baciloscopia Positiva e Cultura Positiva =	
(B) Número de casos com Baciloscopia Positiva e Cultura Não realizada =	
(C) Número de casos com Baciloscopia Negativa e Cultura Positiva =	
(D) Número de casos com Baciloscopia Positiva e Cultura Negativa =	
(E) Número de casos com Baciloscopia Positiva e Cultura Contaminada =	
$\text{Contribuição da Cultura ao Diagnóstico} = \frac{(C)}{(A) + (B) + (C) + (D) + (E)} \times 100 =$	
$\text{Casos de Baciloscopia Positiva e Cultura Negativa} = \frac{(D)}{(A) + (B) + (C) + (D) + (E)} \times 100 =$	
Interpretação:	
(A) + (B)	deve concentrar o maior número possível de casos. Estima-se que, numa situação epidemiológica real, 80% dos casos devem ser diagnosticados pela Baciloscopia;
(C)	deve contribuir com aproximadamente 20% do total de casos diagnosticados;
(D)	deve ser muito baixo em amostras para diagnóstico pulmonar. Valores acima de 2 a 3% das BaciloscoPIas Positivas e Culturas Negativas geralmente indicam problemas técnicos no laboratório que reduzem ou eliminam a viabilidade do bacilo: procedimentos drásticos de descontaminação, meios de cultura com baixa sensibilidade (controle microbiológico) ou estufas com temperaturas altas demais ou oscilantes. Também amostras mal conservadas ou resultados falso-positivos da Baciloscopia podem contribuir para esses resultados de culturas falso-negativas;
(E)	deve ser muito baixo, cerca de 1%. Valores altos indicam problemas técnicos;
Responsável:	

7.17.4.3.3 Formulário – Monitoramento do Índice de Contaminação



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

**Formulário – Monitoramento do
Índice de Contaminação**

$\text{Índice de Contaminação} = \frac{\text{Número Total de Tubos Contaminados}}{\text{Número Total de Tubos Semeados}} \times 100$					
Método de descontaminação	Mês	Nº total de tubos semeados	Nº de tubos contaminados	Índice de contaminação	Responsável
	janeiro				
Obs:					
	fevereiro				
Obs:					
	março				
Obs:					
	abril				
Obs:					
	maio				
Obs:					
	junho				
Obs:					
	julho				
Obs:					
	agosto				
Obs:					
	setembro				
Obs:					
	outubro				
Obs:					
	novembro				
Obs:					
	dezembro				
Obs:					

7.17.4.3.4 Formulário – Monitoramento da Qualidade da Cultura



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Monitoramento da
Qualidade das Cultura

Período de tempo avaliado:				
	Valores normais esperados	Valores encontrados	Se os valores encontrados forem muito maiores, investigar:	Se os valores encontrados forem muito menores, investigar:
Contribuição da Cultura ao Diagnóstico	20%		(A)	(B) e (D)
Porcentagem de amostras baciloscopia positiva e cultura negativa	2 a 3%		(C) e (D)	Não há problemas
Porcentagem de culturas com positividade menor do que na baciloscopia	3%		(C) e (E)	Não há problemas
Índice de Contaminação	3 a 5%		(F)	(G)
(A)	- erros de leitura da Baciloscopia = falsos-negativos; - se a cultura é para investigar sintomáticos respiratórios (SR) com alta suspeita, não há problema; - se a cultura é para investigar pacientes pulmonares com doença pouco avançada, incluindo crianças, não há problema;			
(B)	a solicitação está deficiente, pois não estão sendo investigados os SR pouco avançados. Nesta situação estão sendo investigados pacientes que não são SR;			
(C)	- Excessiva demora entre a coleta e o processamento da amostra; - Descontaminação muito drástica (alta concentração de reagente ou tempo muito longo de contato); - Baixa velocidade ou superaquecimento da centrífuga; - Baixa sensibilidade dos meios de cultura (falta de homogeneidade, superaquecimento do coagulador, excesso de verde malaquita, e pH excessivamente ácido);			
(D)	Erros de leitura da Baciloscopia = falsos-positivos;			
(E)	Tendência a atribuir à Baciloscopia uma positividade maior do que a real;			
(F)	- Amostras conservadas sem refrigeração; - Demora entre a coleta e o processamento da amostra; - Concentração do reagente de descontaminação mais baixa do que o recomendado; - Pouco tempo de contato da amostra com o reagente descontaminante; - Erros no processo de esterilização do reagente; - Descuidos nos procedimentos que requerem esterilidade e de biossegurança (excessivo movimento de pessoas no ambiente de trabalho, geração de correntes de ar por ventiladores ou ar condicionado, etc.)			
(G)	- Concentração do reagente descontaminante mais alta do que o recomendado; - Muito tempo de contato da amostra com o reagente descontaminante; - Concentração de verde malaquita nomeio de cultura mais alta do que o recomendado;			

IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

8.1 Descrição

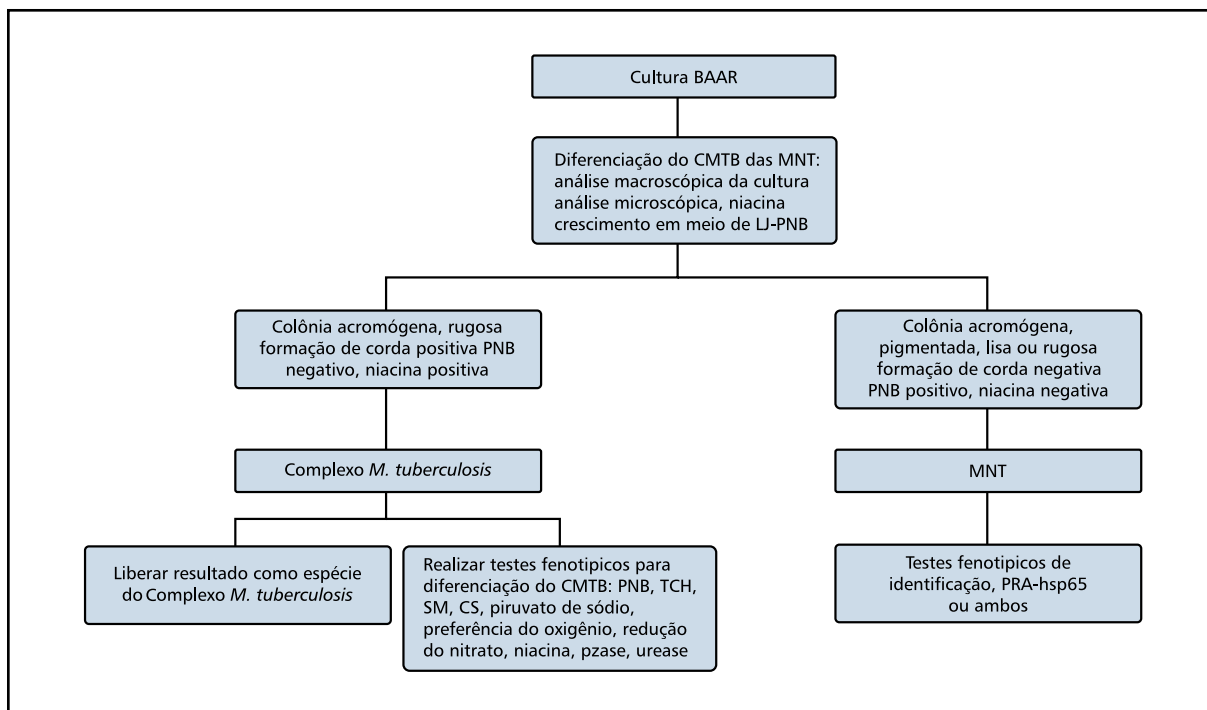
Conforme exposto anteriormente, o gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras denominadas de micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT)^{1,2}.

Os laboratórios que realizam cultura para micobactérias devem ser capazes de separar espécies do CMTB das MNT, do contrário terão que reportar o resultado das culturas positivas, como *Mycobacterium sp.*, ou encaminhar a cultura a um laboratório de referência para realização da identificação da espécie. Um dos aspectos mais importante do processo de isolamento e identificação das micobactérias é o tempo decorrido entre a coleta da amostra clínica e a emissão do laudo com a espécie identificada, para que esse dado seja utilizado pelo médico em benefício do tratamento do paciente.

A identificação das MNT é realizada pelo LRN ou LRR e pode ser feita por métodos fenotípicos, moleculares ou pela combinação de ambos.

Assim, a sequência de métodos para identificação é composta de testes para separação do CMTB das MNT, testes para diferenciação das espécies do CMTB e testes para identificação das MNT conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 Sequência para identificação de micobactérias a partir de uma cultura de micobactérias



8.2 Material para os testes fenotípicos para separação das espécies do Complexo *M. tuberculosis* das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT) e diferenciação das espécies do Complexo *M. tuberculosis*

Equipamentos

- Agitador mecânico de tubos.
- CSB
- Coagulador de meios.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Microscópio óptico.

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Soluções para coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, conforme o Capítulo 6 deste manual.
- Óleo de imersão.
- Solução saturada de Cloreto de mercúrio. O Cloreto de mercúrio é cancerígeno e por isso deve ser manuseado com cuidado, utilizando EPI apropriados e preparado em pequenas quantidades.
- Placas de Petri contendo meio de Middlebrook 7H10 com enriquecimento OADC, preparado de acordo com as recomendações do fabricante.
- Solução de Ácido oxálico a 3%.
- Solução de Tween 80 a 0,1% (v/v) estéril.
- Tubos de 20 x 180 mm com meio de Löwenstein-Jensen (LJ) (Anexo 7.17.1.1 – Capítulo 7).
- Tubos de 12 x 120 mm com 3 ml de meio LJ-piruvato de sódio (Anexo 7.17.1.2 – Capítulo 7).
- Tubos de 12 x 120 mm com 3 ml de meio LJ com PNB 500 µg/ml (Anexo 7.17.1.4 – Capítulo 7).
- Tubos de 12 x 120 mm com 3 ml de meio de LJ com 5µg/ml de TCH (Anexo 8.12.1 – neste capítulo).
- Tubos de 12 x 120 mm com 3 ml de meio de LJ com 2µg/ml de SM (Anexo 8.12.2 – neste capítulo).
- Tubos de 12 x 120 mm com 3 ml de meio de LJ com 20 µg/ml de CS (Anexo 8.12.3 – neste capítulo).
- Tubos de 20 x 100 mm com 10 ml de meio de Middlebrook 7H9 com 0,1% de agar, preparado de acordo com as instruções do fabricante ou meio de Kirchner com 0,1% de agar (Anexo 8.12.4 – neste capítulo).

- Tubos de 20 x 100 mm com 5 ml de meio de Dubos modificado para o teste da pirazinamidase (Anexo 8.12.5 – neste capítulo).
- Solução de Sulfato ferroso amoniacal (Anexo 8.12.6 – neste capítulo).
- Fitas comerciais para o Teste da niacina.
- Solução substrato de nitrato de sódio 22 mM (Anexo 8.12.7 – neste capítulo).
- Reagente A (Anexo 8.12.8 – neste capítulo).
- Reagente B (Anexo 8.12.8 – neste capítulo).
- Reagente C (Anexo 8.12.8 – neste capítulo).
- Zinco em pó.
- Solução uréia – indol (anexo 8.12.9 – neste capítulo) ou discos de uréia.

Insumos

- Alças bacteriológicas descartáveis estéreis.
- Caixas para guardar as lâminas.
- Frascos de vidro esterilizados com tampa de rosca contendo 5-6 pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro e 2 ml de Água destilada estéril. Os frascos com as pérolas de vidro devem ser previamente esterilizados e depois acrescentados os 2 ml de Água destilada estéril.
- Lâminas de vidro com borda fosca para microscopia.
- Luvas descartáveis.
- Pipetas Pasteur descartáveis estéreis.
- Sacos plásticos autoclaváveis.
- *Swabs*.
- Tubos de vidro com tampa de rosca 12 x 120 mm estéreis.

8.3 Pré-requisitos para identificação de espécies^{3, 4}

Antes de iniciar a identificação da espécie deve, se fazer uma avaliação da cultura original, preparar uma suspensão bacteriana (item 8.3.1) e conservar a cepa para eventuais repetições, conforme descrito no Capítulo 10.

O primeiro passo para a identificação é a observação do aspecto da cultura. O objetivo é:

1. Confirmar a pureza da cultura, verificando a ausência de contaminação, pois uma cultura contaminada com outras bactérias causa resultados falsos positivos nos testes de identificação.
2. Verificar o número de colônias na cultura que não deve ser inferior a 20, pois poucas colônias não são suficientes para realização de todos os testes. Nesse caso, recomenda-se fazer um subcultivo da cultura original.
3. Verificar a morfologia e pigmentação das colônias.

4. Verificar a mistura de duas espécies de micobactérias em uma cultura, pela observação de diferenças na morfologia e pigmentação das colônias.

ATENÇÃO: Quando a cultura for em meio líquido, a observação acima não pode ser feita. A identificação pode ser iniciada com base apenas nas características microscópicas da cultura. Se essa cultura tiver grande quantidade de BAAR pode-se fazer a semeadura diretamente nos meios dos testes de inibição de crescimento, tempo e temperatura de crescimento. Os testes bioquímicos deverão ser feitos com o subcultivo do meio líquido.

Se a cultura em meio líquido tiver poucos bacilos, pode-se incubar a cultura por mais alguns dias até obter um bom crescimento ou centrifugar toda a cultura para concentrar os bacilos, ressuspender em 2 ml de Água destilada estéril e inocular nos meios testes para identificação.

O segundo passo para a identificação é a realização de um esfregaço a partir da cultura em meio sólido ou líquido, corar pelo método de Ziehl-Neelsen com o objetivo de:

1. Confirmar se a cultura é de BAAR.
2. Verificar a morfologia dos bacilos e a formação de corda, a qual sugere que a cultura possa ser do CMTB.
3. Confirmar se a cultura não está contaminada por outras bactérias ou fungos. Caso a cultura esteja contaminada, fazer a descontaminação como descrito no item de preparação da suspensão bacteriana (item 8.3.1).
4. Verificar se há mistura de duas espécies de micobactérias em uma cultura. Caso seja detectada cultura mista proceder como no item 8.3.2

O terceiro passo é a preparação da suspensão bacteriana como será descrita a seguir.

8.3.1 Preparo da suspensão bacteriana^{3, 4}

Descrição

Para uniformização do inóculo para os testes de inibição de crescimento em meios contendo diversos componentes e alguns testes bioquímicos, recomenda-se preparar uma suspensão bacteriana.

Procedimento

Transferir com alça descartável estéril de 10 µl colônias da cultura para um tubo contendo 5-6 pérolas de vidro e 2 ml de Água destilada estéril. Homogeneizar em agitador mecânico por aproximadamente 10 segundos. Deixar em repouso por 10 minutos para sedimentação dos aerossóis. Essa suspensão contém aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônias por ml. Caso a cultura esteja contaminada por outras bactérias ou fungos, substituir a Água destilada por 2 ml de uma Solução de Ácido oxálico a 3%, deixar agir por 2 minutos antes de inocular nos meios. Nesse caso, os testes bioquímicos deverão ser realizados com as colônias da subcultivo descontaminada.

8.3.2 Isolamento de colônias

Descrição

A mistura de duas espécies de micobactérias em uma cultura é um fator de erro no processo de identificação. Essa mistura nem sempre é detectada pela análise microscópica ou macroscópica da cultura, por essa razão, anteriormente, recomendava-se iniciar a identificação a partir de uma colônia isolada. Mas esse procedimento acarreta um atraso de um mês na identificação. Devido à exigência pela rapidez na liberação de resultados, recomenda-se fazer o isolamento das colônias somente quando for detectada cultura mista pela análise microscópica ou macroscópica. Em alguns casos a cultura mista só é detectada no final do processo e, nesse caso, faz-se o isolamento das colônias e repete-se todos os testes para identificação⁶.

Procedimento

1. Preparar a suspensão bacteriana como descrito no item 8.3.1 utilizando Solução de Tween 80 a 0,1% (v/v) ao invés de Água destilada.
2. Fazer uma diluição dessa suspensão a 10^{-6} e semear, com alça bacteriológica, uma placa de Petri contendo meio middlebrook 7H10 ou 7H11 acrescido de OADC.
3. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ até que o crescimento seja detectado.
4. A partir das colônias isoladas fazer os subcultivos dos diferentes tipos de colônias.
5. Iniciar a identificação a partir dos subcultivos das colônias isoladas.

8.4 Separação das espécies do Complexo *M. tuberculosis* das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT)

A separação das espécies do CMTB das MNT pode ser feita por quatro testes fenotípicos a partir do primo-cultivo (Quadro 1). É muito importante que os testes sejam feitos utilizando-se culturas com crescimento ativo de 3 a 4 semanas. É indispensável a inclusão de controles positivos e negativos ao realizar os testes.

1. Análise microscópica da cultura.
2. Análise macroscópica da cultura.
3. Inibição de crescimento em meio de LJ-PNB.
4. Teste da Niacina.

ATENÇÃO: Todo material utilizado nos testes de identificação devem ser descontaminados em autoclave antes de serem descartados como resíduos biológicos, conforme descrito no Capítulo 3.

8.4.1 Análise microscópica da cultura^{3, 6}

Descrição

A análise microscópica consiste na confecção de um esfregaço em lâmina de vidro a partir de uma amostra da colônia para avaliar a pureza da cultura, presença de BAAR e a formação de corda.

De modo geral, as micobactérias apresentam-se na forma de bacilos curvos ou retos, com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1 a 10 µm de comprimento⁷.

Quando isolados, os bacilos do CMTB, geralmente, apresentam tamanho entre 3-4 µm. Outra característica é a ausência de emulsificação da colônia na solução utilizada para confecção do esfregaço, ficando visíveis pequenos grumos da colônia. Por outro lado, as colônias de MNT são de fácil emulsificação. As espécies do CMTB apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. A formação de corda pode ser observada em esfregaços de cultura em meio sólido ou líquido, corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Geralmente, os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.

A maioria das MNT não forma corda, exceto algumas espécies como, *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*. O aspecto microscópico das MNT é de bacilos isolados e de tamanho menor que 2 µm (cocobacilos) ou maiores que 5 µm. A diferenciação entre a formação da corda das espécies do CMTB e MNT pode ser feita pela observação do tamanho do bacilo isolado no esfregaço.

Precaução

Os testes de identificação de micobactérias deverão ser realizados em CSB, inclusive o esfregaço para exame microscópico. O técnico deverá estar utilizando equipamentos de proteção individual (EPI), conforme descrito Capítulo 3.

Procedimentos

1. Identificar o número de registro da cultura na parte fosca da lâmina de vidro.
2. Colocar uma gota da Solução saturada de Cloreto de mercúrio, ou de Solução salina ou de Água destilada estéril, no centro da lâmina de vidro.
3. Retirar com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável uma pequena amostra da colônia e colocar em cima da gota.
4. Homogeneizar a amostra na gota fazendo movimentos circulares com a alça bacteriológica.
5. Colocar a lâmina em um suporte e deixar secar à temperatura ambiente, dentro da CSB.
6. Fixar o esfregaço, passando a lâmina três vezes pela chama de um bico de Bunsen, fora da CSB.
7. Corar pelo método de Ziehl-Neelsen conforme descrito no Capítulo 6.
8. Realizar a leitura da baciloscopia no microscópio.

ATENÇÃO: O Cloreto de mercúrio mata quase que instantaneamente os bacilos, permitindo que a fixação e coloração do esfregaço sejam feitas sem risco biológico. No entanto, por ser um produto tóxico recomenda-se preparar pequenas quantidades e sempre estar utilizando EPI quando for manuseá-lo.

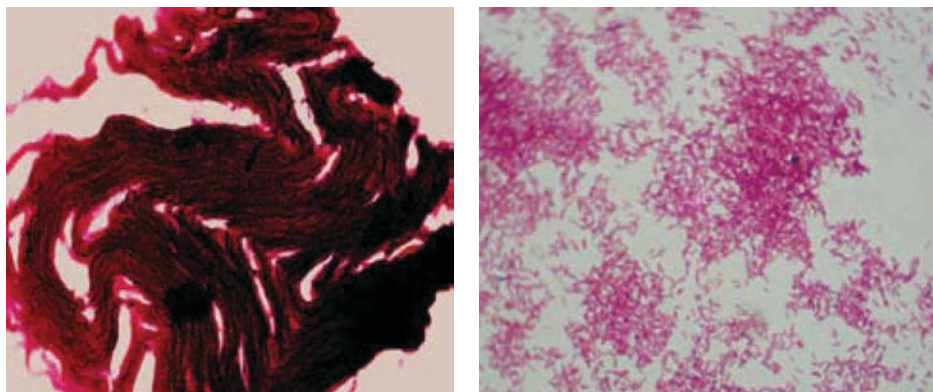
Interpretação de resultados

- BAAR positivo: bacilos corados em vermelho.
- BAAR negativo: ausência de bacilos corados em vermelho.
- Formação de corda positivo: bacilos em paliçada com um aspecto de corda ou grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes.
- Formação de corda negativa: bacilos dispersos no esfregaço, geralmente com tamanho diferente do observado para membros do CMTB.
- Contaminação positiva: presença de outras bactérias (cocos ou bacilos), fungos (leveduras ou filamentos), geralmente corados em azul.
- Contaminação negativa: ausência de outras bactérias ou fungos.

Controles de Referência para interpretação do teste

- Formação de corda positivo: esfregaço de cultura de *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Formação de corda negativo: esfregaço de cultura de *M. avium* (ATCC 25291).

Figura 2 Esfregaços de cultura de micobactérias



A) *M. tuberculosis*

B) MNT

Fonte: Foto cedida por Gleize Villela

8.4.2 Análise macroscópica da cultura^{3, 4, 5}

Descrição

Essa avaliação é feita na cultura original em meio sólido. As colônias de micobactérias cultivadas em meio sólido apresentam diferentes morfologias e pigmentação. A morfologia das colônias pode ser lisa, rugosa, opaca ou transparente. A pigmentação é, também, uma característica importante utilizada na classificação e pode variar de laranja a amarelo intenso.

Procedimento

1. Observar a cultura de preferência com uma lupa manual em um ambiente iluminado e anotar as características da colônia.
2. Observar e anotar o aspecto da colônia: lisa, rugosa, aspecto de couve-flor.
3. Observar e anotar a pigmentação da colônia: acromógena (creme), pigmentada (laranja, amarela, salmão).

Leitura e Interpretação

- Colônia de *M. tuberculosis*: acromógena, geralmente de cor creme, colônia rugosa com aspecto de couve-flor.
- Colônia de MNT: pigmentada ou acromógena, lisa ou rugosa.

8.4.3 Teste de inibição de crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico 500 µg/ml^{3, 4, 8, 9}

Descrição

Esse teste foi descrito por Tsukamura em 1964 e pode ser realizado a partir da cultura ou da semeadura da amostra clínica conforme descrito no Capítulo 7. É um teste muito útil para separação das espécies do CMTB das MNT, pois ao contrário da maioria das MNT, todas as espécies do CMTB não crescem nesse meio. As espécies de MNT que eventualmente podem não crescer em presença de PNB é o *M. kansasii*, *M. xenopi* e *M. gastri*. Por essa razão, esse teste pode auxiliar na detecção de cultura mista (*M. tuberculosis* + MNT).

Procedimento

1. Semear, com uma pipeta Pasteur estéril, uma gota da suspensão bacteriana das culturas em teste e dos controles de referência positivo e negativo, tubos contendo meio de LJ (tubo controle) e LJ-PNB. A gota deve ser semeada no ápice do meio de cultura e deixar escorrer até fim do tubo. Incubar o tubo na posição vertical a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias.

Leitura e interpretação

1. Quando realizado a partir da semeadura da amostra clínica, os resultados obtidos deverão ser interpretados conforme descrito no Capítulo 7.
2. Quando realizado a partir de uma cultura, comparar o crescimento do tubo controle LJ com o tubo LJ-PNB.

Positivo (resistente): presença de crescimento no meio LJ-PNB.

Negativo (sensível): ausência de crescimento no meio LJ-PNB.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. fortuitum* (ATCC 6841) ou *M. avium* (ATCC 25291).
- Negativo: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

8.4.4 Teste da Niacina^{10, 11, 12, 13}

Descrição

A niacina atua como um precursor na biossíntese de co-enzimas envolvidas nas reações de óxido-redução da síntese metabólica de todas as micobactérias. Embora a niacina seja produzida por todas as micobactérias, somente algumas espécies do CMTB como *M. tuberculosis*, *M. africanum* e raras espécies de MNT, como *M. simiae*, *M. chelonae* e *M. marinum* produzem quantidades detectáveis pelo teste *in vitro*. As fitas comerciais estão impregnadas com cloramina e tiocianato de potássio acidificado e ácido p-aminosalicílico (PAS). A combinação desses reagentes leva a formação e liberação de cloreto de cianogênio, o qual reage com PAS na presença da niacina produzindo uma coloração amarela.

Precaução

O teste da niacina deve ser realizado para as espécies de crescimento lento acromógena e a cultura deve ter entre 4 e 5 semanas de crescimento em meio sólido, com pelo menos 50 colônias.

Procedimento

1. Usar um dos tubos da cultura original para realizar o teste da niacina. Se não houver crescimento suficiente para o teste de niacina, fazer um subcultivo do tubo original.
2. Adicionar 1,5 ml de Água destilada estéril nos frascos das culturas teste e nos controles de referência positivo e negativo.
3. Fazer vários cortes na superfície do meio com uma alça descartável estéril, para permitir a extração da niacina contida no meio de cultura.
4. Colocar os tubos em posição horizontal, de modo que o líquido cubra toda a superfície do meio. Deixar por 20 – 30 minutos. Os tubos podem ser colocados a 36°C para acelerar a extração.
5. Transferir 0,6 ml do líquido com uma pipeta Pasteur descartável, estéril, para um tubo com tampa de rosca 12 x 120 mm.
6. Colocar a fita do Teste Niacina dentro de cada tubo teste. Fechar bem a tampa.
7. Deixar à temperatura ambiente por 15 minutos, agitando de vez em quando. Observar a cor amarela que se desenvolve no líquido, não considerar a cor na fita.

Leitura e interpretação

- Teste positivo: desenvolvimento de cor amarela no líquido.
- Teste negativo: não há desenvolvimento de cor amarela.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. tuberculosis* H37Ra – ATCC 25177.
- Negativo: *M. avium* – ATCC 25291.

Quadro 1 Separação do Complexo *M. tuberculosis* das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose

	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	MNT
Pigmentação	ausente	presente/ausente
Formação de corda	+	-
Crescimento em LJ-PNB	-	+/-
Produção de niacina	+/-	-/+

+/- = predominantemente positivo; -/+ = predominantemente negativo; PNB = ácido p-nitrobenzóico.

8.5 Diferenciação dos membros do Complexo *M. tuberculosis*

As espécies do CMTB causam tuberculose (TB) no homem e nos animais. Esse complexo é composto por sete espécies (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* – BCG, *M. caprae*, *M. pinnipedii*). O “*M. canetti*”, uma variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália, ainda não foi reconhecido oficialmente como uma espécie do complexo^{1, 3, 13, 14, 15}.

A identificação do CMTB é essencial para confirmação do diagnóstico, enquanto que a diferenciação das espécies desse complexo é necessária somente em algumas situações, como por exemplo, na suspeita de infecção por *M. bovis*, uma vez que essa espécie é naturalmente resistente a pirazinamida (PZA).

Para fins epidemiológicos, entretanto, pode-se identificar não apenas a espécie, mas também as variantes geográficas de *M. tuberculosis* (as clássicas, as asiáticas) e as duas variantes geográficas de *M. africanum* (tipo I e tipo II). A diferenciação dessas variantes pode ser feita por alguns testes fenotípicos. No entanto, há limitações metodológicas, uma vez que essas variantes apresentam resultados variáveis, (Quadro 2). A diferenciação mais precisa pode ser feita com testes moleculares, tais como RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Spoligotyping e/ou MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersal Repetitive Units – Variable Numbers of Tandem repeats*)^{3, 4}.

Mycobacterium tuberculosis

A espécie *M. tuberculosis*, variante clássica ou asiática, foi classificada no gênero em 1896 por Lehmann e Neumann, redefinida por Runyon e col. em 1967 e posteriormente por Kubica e col. em 1972^{3,7}.

As colônias de *M. tuberculosis* em meio sólido têm aspecto rugoso, assemelhando-se a farelos de pão e de couve-flor, e crescem em meios de cultura contendo glicerol ou piruvato de sódio como fonte de carbono. Os bacilos medem cerca de 0,3-0,5 µm de largura por 2-4 µm de comprimento, podendo apresentar-se ocasionalmente mais curtos ou longos. O esfregaço da cultura, geralmente, apresenta formação de corda. A temperatura de crescimento é restrita à faixa de 34-38°C. Essa espécie é aeróbica, sensível à PZA e à cicloserina (CS) e positiva no teste da redução do nitrato^{3,4}.

A variante clássica é resistente a hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico (TCH) e a asiática é sensível. Ambas são sensíveis ao PNB, e positivas ao teste da niacina, embora existam algumas exceções. Os isolados de *M. tuberculosis* sensíveis a isoniazida (INH) produzem uma reação fortemente positiva da catalase, enquanto que os resistentes a INH freqüentemente produzem reações fracas ou negativas³.

Mycobacterium bovis

A espécie *M. bovis* causa, principalmente, TB em bovinos, mas pode acometer outros animais e o homem. Os bacilos da espécie *M. bovis* costumam ser mais curtos do que os do *M. tuberculosis* e a formação de corda menos freqüente. As colônias em meio sólido são mais planas e lisas do que a variante humana. Crescem em meio de cultura contendo piruvato de sódio em substituição ao glicerol. O crescimento é restrito a faixa de temperatura entre 34-38°C. Essa espécie é microaerófila, sensível ao TCH e a CS, resistente a PZA. O teste da niacina é negativo^{3,4}.

Mycobacterium africanum

A espécie *M. africanum*, foi isolada pela primeira vez na África ocidental por Castets e col. em 1969. Essa espécie apresenta características intermediárias entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Existem duas variantes de *M. africanum*. A variante africana I, originária da África ocidental, é negativa para o teste do nitrato e suas colônias em meio sólido assemelham-se às de *M. bovis*, não apresentando preferência por piruvato de sódio. A variante africana II, originária da África oriental, é positiva para o teste do nitrato e suas colônias assemelham-se às de *M. tuberculosis*. As duas variantes são microaerófilas e são sensíveis a TCH, PZA e CS. O Teste de Niacina é variável para ambas. O crescimento é restrito à faixa de temperatura entre 34-38°C^{3,4}.

Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

É derivado atenuado do *M. bovis*, utilizado na vacina BCG. No entanto, apresenta características morfológicas e de cultura semelhantes às de *M. tuberculosis*. Não apresenta preferência por piruvato de sódio. É negativo para o teste do nitrato (ou fraco reator), aeróbico, sensível à TCH, mas resistente à PZA e CS. O Teste de Niacina é negativo³.

Mycobacterium microti

O *M. microti* foi descrito por Wells em 1937, e foi inicialmente denominado de “vole bacillus”. *M. microti* causa doença em pequenos roedores. A doença é rara em gatos e suínos e muito rara em humanos. Recentemente, isolados de *M. microti* de humanos foram caracterizados com o uso de métodos moleculares¹⁶. De acordo com Yates (1984)¹⁷, as poucas cepas existentes em coleções de cultura têm as características da variante I de *M. africanum*. Os bacilos de *M. microti* podem se diferenciados dos outros membros do CMTB por apresentarem formato curvo¹⁸.

Mycobacterium canetti

Essa espécie foi descrita, em 1969, por George Canetti e foi denominada de *M. tuberculosis canetti* em sua homenagem. Em 1997, van Soolingen e col. descreveram o isolamento de uma cepa denominada So93 com as mesmas características fenotípicas e genotípicas da cepa isolada por Canetti. Desde então alguns casos causados por *M. canetti* têm sido relatados¹⁹.

Essa espécie apresenta colônias lisas, teste de niacina negativo e redução de nitrato positiva. É resistente à TCH, PZA e estreptomicina (SM).

Mycobacterium caprae

Foi originalmente isolada de caprinos na Espanha. Posteriormente foi isolado de gado, suínos e humanos que tiveram contato com caprinos. Apresenta preferência de crescimento em meio com piruvato de sódio em substituição ao glicerol^{20, 21}.

Mycobacterium pinnipedii

Foi originalmente isolado a partir de casos de TB em leões marinhos, focas e tapires brasileiros. Apresenta preferência de crescimento em meio com piruvato de sódio e cresce em temperatura de 33°C^{15, 22}.

8.5.1 Testes Fenotípicos para diferenciação das espécies do Complexo *M. tuberculosis*

A diferenciação das espécies do CMTB pode ser feita por nove testes fenotípicos descritos abaixo. É muito importante que os testes enzimáticos sejam feitos utilizan-

do-se culturas com crescimento ativo de 3 a 4 semanas. É indispensável a inclusão de controles de referência positivos e negativos ao realizar os testes. (Quadro 2).

- 1) Crescimento em meio LJ com glicerol e LJ com piruvato de sódio.
- 2) Inibição de crescimento em meio com TCH.
- 3) Inibição de crescimento em meio com SM.
- 4) Inibição de crescimento em meio com CS.
- 5) Preferência de oxigênio.
- 6) Pirazinamidase.
- 7) Teste de redução do nitrato.
- 8) Urease.
- 9) Niacina.

8.5.1.1 Crescimento em meio LJ e LJ com Piruvato de Sódio^{3, 4}

Descrição

As espécies do CMTB apresentam variações quanto a preferência de fonte de carbono empregada nos meios de cultura. Os meios à base de ovos podem ser formulados com glicerol ou piruvato de sódio como fonte de carbono. As espécies, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*, usualmente crescem melhor em meio de LJ com piruvato de sódio^{3, 15}.

Procedimento

1. Semear, com uma pipeta Pasteur estéril, uma gota da suspensão bacteriana (preparada como descrito no item 8.3.1) em meio de LJ (tubo controle) e LJ com piruvato de sódio.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias.

Leitura e interpretação

- Após 15 dias observar o crescimento nos tubos. Na ausência de crescimento nos dois tubos incubar por mais sete dias.

Controles de referência para interpretação do teste

- Crescimento no meio de LJ com piruvato de sódio: *M. bovis* (ATCC 19210) e *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Crescimento no meio de LJ com glicerol: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

8.5.1.2 Teste de inibição de crescimento em meio com Hidrazida do Ácido Tiofeno 2-Carboxílico (TCH)^{3, 4}

Descrição

As espécies do CMTB apresentam variações quanto ao crescimento em meio de cultura contendo TCH. As espécies *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. tuberculosis variante asiática* não crescem nesse meio, ao contrário das outras espécies de micobactérias^{3, 9}. É um teste útil para diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*. As cepas de *M. bovis* resistentes à INH podem apresentar resistência à TCH³.

Procedimento

1. Semear, com uma pipeta Pasteur, uma gota da suspensão bacteriana (preparada como descrito no item 8.3.1) em meio de LJ (tubo controle) e LJ-TCH, preparada a partir das culturas teste e das culturas dos controles de referência.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias.

Leitura e interpretação

- Após 15 dias observar o crescimento nos tubos. Na ausência de crescimento nos dois tubos incubar por mais sete dias.

Controles de referência para interpretação do teste

- Crescimento no meio de LJ: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) e *M. bovis* (ATCC 19210).
- Crescimento no meio de LJ-TCH: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

8.5.1.3 Teste de inibição de crescimento em meio com Estreptomicina (SM)⁴

Descrição

Esse teste é útil para diferenciação do *M. canetti* das outras espécies do CMTB.

Procedimento

1. Semear, com uma pipeta Pasteur, uma gota da suspensão bacteriana (preparada como descrito no item 8.3.1), em meio de LJ (tubo controle) e LJ-SM, preparada a partir das culturas teste e das culturas dos controles de referência.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias.

Leitura e interpretação

- Após 15 dias, observar o crescimento nos tubos. Na ausência de crescimento nos dois tubos incubar por mais sete dias.

Controles de referência para interpretação do teste

- Crescimento no meio de LJ: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *M. canetti*.
- Crescimento no meio de LJ com SM: *M. canetti* ou *M. tuberculosis* resistente a SM.

8.5.1.4 Teste de inibição de crescimento em meio com Cicloserina (CS)³

Descrição

Esse teste é útil para diferenciar *M. bovis*-BCG de outras espécies do CMTB. A espécie *M. bovis*-BCG cresce em meio de LJ-CS ao contrário das outras espécies do CMTB (David *et al.*, 1989).

Procedimento

1. Semear, com uma pipeta Pasteur estéril, uma gota da suspensão bacteriana (preparada como descrito no item 8.3.1), em meio de LJ (tubo controle) e LJ-CS.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias.

Leitura e interpretação

- Após 15 dias, observar o crescimento nos tubos. Na ausência de crescimento nos dois tubos incubar por mais sete dias.

Controles de referência para interpretação do teste

- Crescimento no meio de LJ: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) e *M. bovis*-BCG (cepa Moreau).
- Crescimento no meio de LJ-CS: *M. bovis*-BCG (cepa Moreau).

8.5.1.5 Preferência de oxigênio^{3, 4}

Descrição

Essa técnica pode ser feita com meio de Middlebrook 7H9 ou com o meio de Kirchner contendo 0,1% de agar.

Procedimento

1. Preparar o meio de cultura semi-sólido (Middlebrook 7H9 ou Kirchner) e distribuir 10 ml em tubos de 20 x 100 mm com tampa de rosca. Manter na posição vertical.
2. Pipetar 0,2 ml da suspensão bacteriana preparada como no item 8.3.1, a partir das culturas teste e das culturas dos controles de referência, cerca de 10 mm abaixo da superfície do meio; fechar bem o tubo e misturar com movimentos circulares tomando cuidado para não formar bolhas.
3. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias.

Leitura e interpretação

- Aeróbico: presença de crescimento próximo à superfície.
- Microaerófilo: presença de crescimento na forma de um anel a cerca de 10 a 20 mm abaixo da superfície (às vezes o crescimento pode se estender para cima).

Controles de referência para interpretação do teste

- Aeróbico: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Microaerófilo: *M. bovis* (ATCC 19210).

8.5.1.6 Piramidaze (PZAse)⁴

Descrição

Os isolados bacterianos sensíveis à PZA possuem a enzima pirazinamidase que converte a PZA em ácido pirazinóico e amônia. A detecção dessa enzima é uma alternativa utilizada para fins de identificação.

Precauções

É necessário inocular pelo menos uma alçada de bactéria para que não ocorra um resultado falso negativo.

Procedimento

1. Colocar sobre a superfície do meio (anexo 8.12.5), com auxílio de uma alça bacteriológica, uma quantidade grande do crescimento bacteriano.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por seis dias.

Leitura e interpretação

1. Adicionar 1 ml de Solução de Sulfato ferroso amoniacal 1% a cada tubo (preparado no momento de uso).
 2. Colocar na geladeira por 3 horas.
- Teste positivo: a formação de um anel rosa imediatamente abaixo da superfície do agar difundindo para dentro do meio significa que o teste é sensível à PZA.
 - Teste negativo: a ausência da formação do anel rosa no agar significa que o teste é resistente a PZA.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25 177).
- Negativo: *M. bovis*-BCG (cepa Moreau).

8.5.1.7 Teste da redução do nitrato^{12, 23}

Descrição

O teste do nitrato detecta a capacidade da micobactéria de reduzir o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) pela ação da enzima nitrato-redutase. As espécies que produzem a nitrato-redutase reduzem o nitrato a nitrito em condições anaeróbicas com objetivo de obter o oxigênio do nitrato para seu metabolismo. Os nitritos formados na reação, em contato com ácido acético ou clorídrico desenvolvem coloração rosa quando adicionado de sulfanilamida e naftiletilenodiamina – reação de Griess.

Precaução

Para o teste da redução do nitrato, a cultura de micobactérias de crescimento lento não deve ter mais de quatro semanas de crescimento em meio sólido. As culturas de micobactérias de crescimento rápido devem ser testadas com até duas semanas de crescimento.

Procedimento

1. Adicionar 2 ml do substrato nitrato de sódio 22 mM em tubos de 12 x 120 mm.
2. Transferir, para o tubo contendo substrato, uma alça cheia de crescimento bacteriano das culturas teste e das culturas dos controles de referência.
3. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 horas.
4. Após 2 horas, adicionar:
 - Uma gota do reagente A
 - Duas gotas do reagente B
 - Duas gotas do reagente C

Leitura e interpretação

Observar e anotar imediatamente o aparecimento de cor no substrato de acordo com a escala abaixo:

COR	INTENSIDADE DA COR
Rosa pálido	+/-
Rosa claro	1+
Rosa escuro	2+
Vermelho	3+
Vermelho escuro	4+
Vermelho arroxeadado	5+

Teste positivo: 3+ a 5+

Teste negativo: incolor, +/- a 2+

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Negativo: substrato do teste ou *M. avium* (ATCC 25291).

ATENÇÃO: Todos os resultados devem ser confirmados porque algumas micobactérias são capazes de reduzir o nitrito a amoníaco, podendo dar resultados falsos negativos (David et al., 1994). Para confirmação, adicionar uma pequena quantidade (pitada) de zinco em pó a todos os tubos negativos. Se houver NaNO_3 na suspensão, no momento em que o zinco é adicionado ocorre imediatamente mudança de cor para o vermelho. Essa mudança caracteriza o teste verdadeiro negativo. Se, após a adição do zinco, a cor continuar inalterada, significa que a reação já ocorreu e foi além da redução de nitrito, caracterizando, portanto, um teste positivo.

8.5.1.8 Teste combinado da produção de niacina e redução de nitrato¹⁰

Descrição

Os testes da niacina e redução do nitrato podem ser combinados, reduzindo o tempo e material.

Procedimentos

1. Em uma cultura em LJ com menos de quatro semanas, acrescentar 2,5 ml do substrato de nitrato de sódio e fazer vários cortes na superfície do meio.
2. Repetir o item acima para as culturas dos controles de referência.
3. Deixar os tubos na posição vertical, por 2 horas, em Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
4. Transferir 0,6 ml do líquido para um tubo de rosca 12 x 120 mm e proceder como no teste da niacina (item 8.4.4).
5. Adicionar ao tubo de cultura, com o substrato nitrato de sódio, os reagentes de revelação (A, B e C), de acordo com o teste da redução do nitrato (item 8.5.1.7).

Controles de referência para interpretação do teste – Teste Niacina

- Positivo: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Negativo: *M. avium* (ATCC 25291).

Controles de referência para interpretação do teste – Teste do Nitrato

- Positivo: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Negativo: substrato do teste ou *M. avium* (ATCC 25291).

8.5.1.9 Urease^{4, 10}

Descrição

Algumas espécies de micobactérias são capazes de hidrolisar a uréia, que pode ser detectada por um simples teste baseado na mudança de pH da solução. Esse teste é útil na identificação das espécies acromógenas e escotocromógenas e na identificação de *M. bovis* e *M. bovis*-BCG, que apresentam reação fortemente positiva^{4, 10}.

Procedimentos

1. Inocular um tubo contendo 0,5 ml da Solução Ureia-indol com uma alçada de crescimento bacteriano da cultura teste e das culturas dos controles de referência.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Leitura e interpretação

- Fazer a leitura após 2 e 18 horas de incubação.
- Teste positivo: mudança de cor amarela para rosa.
- Teste negativo: sem alteração de cor (amarelo).

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. bovis*-BCG (cepa Moreau) ou *M. kansasii* (ATCC 12478).
- Negativo: substrato do teste ou *M. avium* (ATCC 25291).

8.5.1.10 Método alternativo da Urease

Procedimento

1. Preparar tubos de 12 x 120 mm contendo 0,5 ml de Água destilada estéril.
2. Colocar um disco de uréia em cada um dos tubos.
3. Adicionar uma alçada de crescimento bacteriano da cultura nos tubos teste e uma alçada nos tubos controles com as culturas de referência.
4. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Leitura e interpretação

- Fazer a leitura após uma hora, e diariamente, por 3 dias seguidos.
- Teste positivo: mudança da cor do meio para roxo ou rosa escuro.
- Teste negativo: não há mudança de cor do meio.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. bovis*-BCG (cepa Moreau) ou *M. kansasii* (ATCC 12478).
- Negativo: *M. avium* (ATCC 25291).

Quadro 2 Características das espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*

Testes	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. bovis</i>		<i>M. africanum</i>		<i>M. microti</i>	<i>M. canetti</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. pinnipedii</i>
	Clássico	Asiática	Clássico	BCG	Tipo I	Tipo II				
Morfologia da colônia	eugônica rugosa	eugônica rugosa	disgônica lisa	eugônico rugosa	disgônica rugosa	eugônica rugosa	disgônica rugosa	eugônica lisa	disgônica lisa	disgônica rugosa
Niacina	+	+	-	-	+/-	+/-	+	-	-	- *
Nitrato	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Urease	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+	ND	ND
PZase	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
TCH	R	S	S	S	S	R	S	R	-	-
SM	S	S	S	S	S	S	S	R	ND	S
CS	S	S	S	R	S	S	SI	S	ND	ND
LJ/PS	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Preferência de oxigênio	aeróbico	aeróbico	micro	aeróbico	micro	micro	micro	ND	micro	ND

+/- = resultado variável, R = resistente à droga, S = sensível à droga, ND = Não há dados, micro = microaerofílico, LJ/PS = preferência por piruvato de sódio, PZase = pirazinamidase, TCH = hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico, SM = estreptomicina, CS = cicloserina, -* = geralmente negativo.

8.6 Identificação fenotípica das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT)

Descrição

O método fenotípico de identificação inclui um conjunto de testes baseados em características culturais e bioquímicas, tais como: tempo e temperatura de crescimento, que varia de acordo com a espécie de 25 a 45°C, pigmentação, capacidade de crescimento em meios seletivos e testes enzimáticos.

Em 1958, Runyon propôs uma classificação das MNT em quatro grupos baseada na pigmentação e tempo de crescimento das colônias. As espécies que apresentam crescimento em meio sólido após sete dias são classificadas como de crescimento lento e aquelas que apresentam crescimento em menos de sete dias, de crescimento rápido²⁴. Essa classificação é, ainda, utilizada para identificação das MNT juntamente com outros testes.

Quadro 3 Classificação das micobactérias de acordo com tempo de crescimento e pigmentação das colônias

Grupo	Característica da cultura
I	Fotocromógenas – caracteriza-se pelo crescimento lento das colônias. As culturas desenvolvem pigmento amarelo somente quando expostas à luz. Exemplo: <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> .
II	Escotocromógenas – caracteriza-se pelo crescimento lento das colônias. As culturas desenvolvem pigmento tanto na luz como no escuro. Exemplo: <i>M. goodii</i> , <i>M. szulgai</i> .
III	Acromógenas – caracteriza-se pelo crescimento lento das colônias. As culturas não produzem pigmento. Exemplo: <i>M. avium</i> , <i>M. terrae</i> .
IV	Crescimento rápido – caracteriza-se pelo crescimento rápido das colônias. As colônias podem ser pigmentadas ou não. Exemplo: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> .

Abaixo, serão descritos os principais testes de identificação empregados no método fenotípico, exceto os que já foram descritos previamente nos itens 8.3 e 8.4.

O primeiro passo para identificação é organizar o conjunto de meios de cultura controles, de meios contendo inibidores e tubos contendo as soluções e substratos dos testes bioquímicos.

O segundo passo, comum a todos os testes, é o preparo da suspensão bacteriana para o inóculo nos meios e substratos conforme item 8.3.1, das culturas testes e das culturas dos controles de referência.

Os procedimentos de semeadura, leitura e interpretação serão descritos separadamente para cada método.

Testes

1. Produção de pigmento.
2. Crescimento a 25°C.
3. Crescimento a 45°C.
5. Determinação do tempo de crescimento:
 - a) teste do tempo de crescimento em LJ;
 - b) teste de inibição de crescimento em meio de Sauton com ácido pícrico;
 - c) teste de inibição de crescimento em meio de agar comum.
6. Inibição de crescimento em meio com NaCl 5%.
7. Arilsulfatase 3 e 14 dias.
8. Hidrólise do tween 80.
9. β -galactosidase.
10. Redução do telurito de potássio.

Provas descritas nos itens 8.3 e 8.4.

11. Inibição de crescimento em meio com PNB.

12. Redução do nitrato.
13. Urease.
14. Pirazinamidase.

Testes para identificação de espécies de MNT de crescimento rápido

15. Captação do ferro.
16. Inibição de crescimento em meio com citrato de sódio.
17. Inibição de crescimento em meio com manitol.
18. Inibição de crescimento em meio com inositol.

Precauções

É muito importante que os testes sejam feitos utilizando-se culturas jovens, com crescimento ativo de 3 a 4 semanas. Culturas com mais de cinco semanas não são apropriadas. É indispensável a inclusão de controles positivos e negativos ao realizar os testes. Nos testes bioquímicos, o controle negativo é sempre feito com o substrato específico ou meio de cultura no qual o teste é realizado.

Os testes de identificação de micobactérias deverão ser realizados em CSB. O técnico deverá estar utilizando EPI, como luva e avental.

Material

Equipamentos

- Agitador mecânico de tubos.
- Coagulador de meios.
- CSB.
- Estufa bacteriológica a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e $45 \pm 1^\circ\text{C}$

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Tubos 12 x 120 mm com 2 ml de meio de LJ. (Anexo 7.17.1.1 - Capítulo 7)
- Tubos 12 x 120 mm com 2 ml de meio de LJ com 5% de NaCl (Anexo 8.12.12).
- Tubos com 2 ml do substrato arilsulfatase 3 dias (Anexo 8.12.13).
- Tubos com 2 ml do substrato arilsulfatase 14 dias (Anexo 8.12.13).
- Solução de reveladora de Carbonato de sódio 2N (Anexo 8.12.13.1).
- Tubos 12 x 120 mm com 2 ml do substrato Tween 80 (Anexo 8.12.14).
- Tubos 12 x 120 mm com 2 ml de meio Dubos modificado (Anexo 8.12.15).
- Tubos com 2,5 ml de meio de Middlebrook 7H9 acrescido de ADC, preparado conforme recomendações do fabricante.
- Solução de Telurito de potássio 0,2% (Anexo 8.12.16).

- Tubos 12 x 120 mm com 3 ml de meio de LJ-citrato férrico amoniacal (Anexo 7.17.1.3 – Capítulo 7).
- Tubos 12 x 120 mm com 3 ml de meio base para os testes de utilização de inositol, manitol, citrato de sódio (Anexo 8.12.17).
- Tubos 12 x 120 mm com 3 ml de meio citrato de sódio (Anexo 8.12.19).
- Tubos 12 x 120 mm com 3 ml de meio manitol (Anexo 8.12.20).
- Tubos 12 x 120 mm com 3 ml de meio inositol (Anexo 8.12.21).

Insumos

- Alças bacteriológicas descartáveis estéreis.
- Frascos de vidro esterilizados com tampa de rosca contendo 5-6 pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro e 2 ml de Água destilada estéril. Os frascos com as pérolas de vidro devem ser previamente esterilizados e depois acrescentados os 2 ml de Água destilada estéril.
- Luvas descartáveis.
- Pipetas Pasteur descartáveis estéreis.
- Papel alumínio ou caixa com tampa.
- Sacos plásticos para autoclave.
- *Swabs*.
- Tubos de vidro de 12 x 120 mm estéreis.

8.6.1 Temperatura de crescimento e pigmentação das colônias^{3, 4, 10}

Descrição

Esses testes permitem classificar a micobactéria em um dos quatro grupos de Runyon e identificar a temperatura ótima de crescimento. Em geral, a temperatura ótima de crescimento é 36-37°C. No entanto, algumas espécies crescem melhor em temperaturas mais baixas (25-30°C) como o *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum* e outras em temperaturas mais elevadas, como *M. xenopi* (42°C) e *M. thermoresistibile* (52°C).

Precauções

Para avaliação das temperaturas de crescimento, é imprescindível que as estufas sejam calibradas e monitoradas com termômetros de máxima e mínima.

Procedimento

Com pipeta Pasteur descartável e estéril, inocular cinco tubos com meio de LJ, uma gota da suspensão bacteriana no início da superfície do meio e incubar os tubos na posição horizontal por 15 dias.

- 1) Dois tubos de LJ para a prova de produção de pigmento.
Tubo 1 a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, dentro de uma caixa fechada, sem penetração de luz ou em-
brulhado em papel alumínio.
Tubo 2 a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em uma bandeja exposta à luz da estufa.
- 2) Três tubos de LJ para a prova das temperaturas de crescimento. Incubar nas tem-
peraturas de Estufa bacteriológica a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e $44 \pm 1^\circ\text{C}$.
Os tubos dos testes da temperatura serão utilizados como controle de cresci-
mento. No caso de identificação de micobactérias isoladas de lesões de pele e tecidos
moles, incubar a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Leitura e interpretação do teste produção de pigmento

Comparar o crescimento do tubo 1 com o crescimento do tubo 2 e classificar:

- a) Escotocromógena, se as colônias dos tubos 1 e 2 forem pigmentadas.
- b) Fotocromógena, se as colônias do tubo 1 não apresentarem pigmentação e as
colônias do tubo 2 forem pigmentadas.
- c) Acromógenas, se as colônias dos tubos 1 e 2 não apresentarem pigmento.

Controles de referência para interpretação do teste

- a) Escotocromógena – *M. gordonae* (ATCC 14470).
- b) Fotocromógena – *M. kansasii* (ATCC 12478).
- c) Acromógena – *M. terrae* (ATCC 15755) ou *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC
25177).

Leitura e interpretação da temperatura de crescimento

Comparar o crescimento do tubo 2 mantido a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ com os tubos incubados
nas temperaturas de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $44 \pm 1^\circ\text{C}$. Anotar o resultado.

8.6.2 Determinação do tempo de crescimento⁹

Descrição

Esse teste permite a classificação das MNT em micobactérias de crescimento len-
to ou rápido. No entanto, algumas espécies apresentam crescimento intermediário,
por isso a definição de crescimento lento ou rápido é feita com base em três testes⁹.

- a) Determinação do tempo de crescimento das colônias em meio LJ.
- b) Crescimento em meio de agar comum.
- c) Crescimento em meio de Sauton com ácido pícrico 0,2%.

Procedimento para determinação do tempo de crescimento das colônias em meio LJ

- Inocular um tubo de LJ, com uma gota da suspensão bacteriana. Incubar por 15 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Leitura e interpretação

- Observar o crescimento após sete dias de incubação e classificar em:
 - Crescimento rápido: se houver crescimento abundante.
 - Crescimento lento: se não houver crescimento.

Controles de referência para interpretação do teste

- Crescimento rápido: *M. fortuitum* (ATCC 6841).
- Crescimento lento: *M. avium* (ATCC 25291) ou *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

Procedimento para determinação do crescimento em agar comum e meio contendo ácido pícrico

1. Inocular, com pipeta Pasteur estéril, uma gota da suspensão bacteriana nos tubos agar comum e Sauton com ácido pícrico.
2. Incubar por 15 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Leitura e interpretação

- Crescimento rápido: crescimento nos dois meios.
- Crescimento lento: ausência de crescimento nos dois meios.

8.6.3 Teste de inibição de crescimento em meio com NaCl 5%^{4,9}

Descrição

Algumas espécies de micobactérias são capazes de crescer em meio de cultura contendo NaCl a 5%. A maioria das espécies de crescimento rápido cresce nesse meio, exceto *M. chelonae*, *M. immunogenum* e *M. mucogenicum*. Dentre as espécies de crescimento lento somente o *M. triviale* cresce nesse meio.

Procedimento

- 1 Com pipeta Pasteur descartável e estéril, inocular uma gota da suspensão bacteriana no início da superfície dos meios LJ e LJ-NaCl. Incubar os tubos na posição horizontal por 15 dias.

Leitura e interpretação

- Ausência de crescimento: sensível.

- Crescimento leve ou até 10 colônias: +.
- Crescimento médio de 11 a 100 colônias: ++.
- Crescimento confluyente ou acima de 100 colônias: +++.
- Comparar crescimento do tubo controle com o tubo com droga considerando o número de cruzes.
- Sensível: crescimento no tubo controle e nenhum crescimento no tubo teste.
- Resistente: se houver crescimento semelhante, em cruzes, no tubo controle e teste.

Controles de referência para interpretação do teste

- Sensível: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).
- Resistente: *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. triviale* (ATCC 15754).

8.6.4 Arilsulfatase 3 e 14 dias¹⁰

Descrição

A arilsulfatase é uma enzima capaz de hidrolisar a ligação entre o grupo sulfato e o anel aromático em um composto dissulfato potássico de fenolftaleína. A detecção da fenolftaleína liberada pela hidrólise enzimática é evidenciada pelo desenvolvimento da cor rosa após adição do carbonato de sódio. A intensidade da cor varia de acordo com a espécie. É um teste útil para identificação das espécies acromógenas de crescimento rápido e *M. xenopi*¹⁰.

Procedimento

1. Inocular 5 gotas da suspensão bacteriana em cada um dos tubos: arilsulfatase 3 e 14 dias.
2. Incubar a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Após 3 dias de incubação, adicionar 4 gotas da Solução de Carbonato de sódio 2N ao tubo de 3 dias.
4. Após 14 dias de incubação adicione 4 gotas de Solução de Carbonato de sódio 2N ao tubo de 14 dias.

Leitura e interpretação

- Positivo: aparecimento de cor que varia do rosa ao vermelho. Anotar o resultado em cruzes de acordo com a intensidade da cor.
- Negativo: substrato permanecer incolor.

Obs.: Considerar positivo a partir do tubo 3+ da escala do Nitrato.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. xenopi* (ATCC 6841).
- Negativo: *M. avium* (ATCC 25291).

8.6.5 Hidrólise do tween 80^{10, 13}

Descrição

O vermelho neutro ligado ao tween 80 adquire uma cor âmbar. A hidrólise do tween por uma esterase libera o vermelho que retorna à sua cor original. Esse teste é útil para identificação das espécies de crescimento lento.

Procedimento

1. Inocular 5 gotas da suspensão bacteriana no tubo com o substrato do teste. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias.

Leitura e interpretação

- Observar a mudança de cor após 5 e 10 dias.
- Positivo: alteração da cor do substrato de âmbar para rosa ou vermelho.
- Negativo: sem alteração da cor do substrato.

NOTA: é necessário que o meio mude de cor; se as colônias apresentarem cor vermelha, mas o meio permanecer âmbar, o teste é considerado negativo.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. kansasii* (ATCC 12478).
- Negativo: *M. avium* (ATCC 25291).

8.6.6 β -Galactosidase^{9, 10}

Descrição

A β -galactosidase é uma enzima induzida, ou seja, é produzida somente quando exposta ao substrato específico. Sua ação é específica contra as galactosidases simples. Esse teste consiste na detecção da enzima β -galactosidase utilizando o composto 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG)¹⁰.

Procedimento

1. Inocular 5 gotas da suspensão bacteriana no tubo com o substrato do teste.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias.

Leitura e interpretação

- Positivo: alteração da cor do substrato de incolor para amarelo.
- Negativo: sem alteração da cor do substrato.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. chelonae* (NCTC 946).
- Negativo: *M. avium* (ATCC 25291).

8.6.7 Redução do Telurito de Potássio^{4, 10, 13}

Descrição

A maioria das micobactérias pode reduzir o telurito de potássio a telurito metálico em um cultivo líquido. A diferença entre as espécies consiste na velocidade da redução. As espécies do complexo *M. avium* e as de crescimento rápido são capazes de reduzir o telurito em três dias^{4, 10, 13}.

Procedimento

1. Inocular uma gota da suspensão bacteriana no tubo contendo 2,5 ml de meio Middlebrook 7H9.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias.
3. Após sete dias adicionar 2 gotas da Solução de Telurito de potássio.
4. Re-incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por mais três dias.

Leitura e interpretação

- Observar a formação de um precipitado preto metálico no fundo do tubo. Se após três dias não houver formação do precipitado, incubar por mais 6 dias.
- Positivo: formação de um precipitado preto metálico no fundo do tubo.
- Negativo: ausência do precipitado. Algumas espécies podem produzir um precipitado marrom que deve ser considerado negativo.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. avium* (ATCC 25291).
- Negativo: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

8.6.8 Captação do Ferro^{4, 13}

Descrição

Esse teste baseia-se na capacidade de algumas espécies de micobactérias em captar o Citrato férrico amoniacal e reduzi-lo a Óxido de ferro. É indicado para separar *M. chelonae* de *M. fortuitum*^{4, 13}.

Procedimento

Inocular uma gota da suspensão bacteriana no tubo contendo LJ com Citrato férrico amoniacal. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por duas semanas.

Leitura e interpretação do teste produção de pigmento

- Positivo: colônias adquirem coloração marrom metálica escura.
- Negativo: sem alteração de cor.

Controles de referência para interpretação do teste

- Positivo: *M. fortuitum* (ATCC 6841).
- Negativo: *M. chelonae* (NCTC 946) ou *M. abscessus* (ATCC 19977).

8.6.9 Utilização dos Substratos Inositol, Manitol e Citrato de Sódio^{4, 25}

Descrição

Esses testes se baseiam na capacidade das MNT acromógenas de crescimento rápido de utilizarem diversas substâncias como única fonte de carbono. É um teste útil para diferenciação entre *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*.

Procedimento

1. A partir da suspensão bacteriana, preparar diluições seriadas em Água destilada estéril até que não seja visível turbidez.
2. Usar essa última diluição para inocular 0,1 ml em cada um dos tubos com meio com Citrato de sódio, inositol ou manitol e um tubo controle.
3. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias.

Leitura e interpretação

- Positivo: crescimento no tubo controle e nos meios testes contendo Citrato de sódio, inositol ou manitol.
- Negativo: crescimento no tubo controle e ausência de crescimento no meio teste.

Controles de referência para interpretação do teste

- Manitol positivo: *M. smegmatis* (ATCC 19420).
- Inositol positivo: *M. smegmatis* (ATCC 19420).
- Citrato de sódio positivo: *M. smegmatis* (ATCC 19420).

8.7 Controle de qualidade interno

Todos os meios e reagentes utilizados nos testes de identificação devem ser submetidos ao CQI realizado pelo laboratório, em todo novo lote de meios e reagentes, considerando os aspectos macroscópicos (cor, consistência, volume) e o controle microbiológico, de acordo as recomendações feitas no Capítulo 7.

Quadro 4 Testes úteis para a identificação das MNT de crescimento lento mais frequentemente isoladas de material clínico

Espécie	Pigmento	PNB	Ácido picrico	Agar comum	NaCl 5%	PZA	Aril		Tween 80	β – gal	Telurito		Nitrito	Urease	25°C	45°C
							3 dias	15 dias			3 dias	9 dias				
<i>M. avium</i>	A	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+/-	-
<i>M. intracellulare</i>	A	+	-	-	-	+	+/-	+/-	-	-	+	+			+	+/-
<i>M. terrae</i>	A	+	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>M. triviale</i>	A	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	A	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>M. celatum</i>	A	+	-	-	-	+/-	-	+	-	ND	-	-	-	-	+	+
<i>M. malmoense</i>	A	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+/-	+	-
<i>M. kansasii</i>	F	+/-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>M. marinum</i>	F	+/-	-	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. asiaticum</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+/-
<i>M. simiae</i>	F	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>M. lentiflavum</i>	E	+	-	-	ND	+/-	-	+/-	-	ND	-	ND	-	-	+	-
<i>M. goodii</i>	E	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. szulgai</i> *	E/F	+	-	-	-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+	+	+	-
<i>M. scrofulaceum</i>	E	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+/-	+	+	+/-
<i>M. xenopi</i>	E/A	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

A=acromógena, F= fotocromógena, E= escotocromógena, + >85% dos isolados são positivos; - < 15% dos isolados são positivos; +/- 50-85% dos isolados são positivos; * Fotocromógena a 25°C; ND, não definido

Quadro 5 Testes úteis para a identificação das MNT de crescimento rápido mais frequentemente isoladas de material clínico

Espécie	Pigm	PNB	Ácido pírico	Agar comum	NaCl 5%	Aril (3 dias)	β -gal	Ferro	Nitrato	Manitol	Inositol	Citrato	25°C	45°C
<i>M. aurum</i>	E	+	+	+	V	V	-	+	V	+	+	+	+	+
<i>M. neoaurum</i>	E	+	+	+	ND	-	-	ND	+	+	+	+	+	-
<i>M. flavescens</i>	E	+	+	+	+	-	-	-	+	V	-	-	+	V
<i>M. phlei</i>	E	+	+	+	+	-	+	+	V	+	-	-	V	+
<i>M. chelonae</i>	A	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. abscessus</i>	A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. fortuitum</i>	A	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	V
<i>M. peregrinum</i>	A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>M. immunogenum</i>	A	+	ND	ND	-	+	ND	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. mucogenicum</i>	A	+	+	+	-	+	-	-	V	+	-	+	+	-
<i>M. smegmatis</i>	A	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. wolinskyi</i>	A	+	+	+	+	-	ND	+	+	+	+	V	+	+

A=acromógena, F= fotocromógena, E= escotocromógena; + >85% das cepas são positivas; - < 15% cepas são positivas; V=variável; ND=não definido.

8.8 Identificação molecular pelo Método Molecular de PRA-*hsp65*²⁶

Descrição

O método de PRA-*hsp65* (do inglês *Polimerase Chain Reaction Restriction Analysis of the gene hsp65*) foi descrito por Telenti e col. em 1993. Esse método diferencia a maioria das espécies de MNT, mas não as do CMTB. Resumidamente, um fragmento de 439 pb do gene *hsp65* é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e digerido com duas enzimas de restrição, *BstE* II e *Hae* III. A determinação da espécie é possível comparando os padrões de restrição com um algoritmo. O algoritmo apresentado neste manual consiste de um compilado de perfis publicados por Telenti e col. (1993), ampliado por outros autores^{27, 28, 29} e disponível na página eletrônica <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Materiais

Equipamentos

- Banho-maria a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e $59 \pm 1^\circ\text{C}$.
- CSB.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas automáticas.
- Sistema de gel eletroforese.
- Sistema para documentação de gel de agarose.
- Termociclador.

Reagentes

- Agarose ultrapura.
- Enzimas de restrição *Hae* III e *BstE* II.
- Água ultrapura esterilizada do tipo Milli-Q.
- Glicerol para biologia molecular esterilizado.
- Marcador de peso molecular de 50 e 100 pb.
- Oligonucleotídeo iniciador TB11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT).
- Oligonucleotídeo iniciador TB12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT).
- Deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- Solução de arraste de Azul de bromofenol (Anexo 8.12.23).
- Solução de Brometo de etídio a 0,5% (Anexo 8.12.24). Manter em frasco escuro.
- *Taq* DNA polimerase.
- Tampão TBE 0,5x concentrado (Anexo 8.12.22).

Insumos

- Microtubos de polipropileno de 0,2 e 1,5 ml estéreis, livres de Dnase.
- Ponteiras com barreira estéreis.

Precauções

Para realização da reação de PCR são necessárias salas separadas para extração de DNA, preparação da mistura para PCR e adição de DNA na reação e eletroforese dos produtos amplificados.

Extração do DNA

1. Retirar uma alça cheia do crescimento bacteriano em meio sólido e colocar em um microtubo contendo 500 µl de água ultrapura esterilizada.
2. Se for utilizar cultura em meio líquido, transferir 1,5 ml da cultura em um microtubo esterilizado, centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos e ressuspender o sedimento em 100 µl de água purificada do tipo Milli-Q esterilizada.
3. Aquecer por 20 minutos a 99°C em termobloco localizado dentro da CSB.
4. Congelar a -20°C. No momento de uso, descongelar, centrifugar brevemente e usar 5 µl do sobrenadante.

Figura 3 Microtubo contendo uma alça de crescimento bacteriano em 500 µl de água ultrapura esterilizada



Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS

Reação em Cadeia da Polimerase do gene *hsp65*

1. Preparar a mistura de reagentes para a reação de PCR, descrita no quadro a seguir, em uma sala limpa ou em fluxo laminar utilizado para preparação da PCR.
2. Pré-incubar o glicerol em banho-maria a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para facilitar a pipetagem.
3. Numerar os tubos testes, mantendo-os fechados até o momento de uso.

ATENÇÃO: A mistura com os reagentes para a reação de PCR pode ser adquirida pronta necessitando apenas acrescentar o glicerol e os iniciadores. Nesse caso, calcular a quantidade de acordo com as recomendações do fabricante.

Mistura de reagentes para reação de PCR

Reagentes	Concentração dos reagentes estoque	Uma reação
H ₂ O ultrapura estéril	-	27,8 µl
Glicerol estéril	10%	5 µl
Tampão 10X	10x	5 µl
MgCl ₂	50 mM	1 µl
DNTP (A, T, C, G)	1 mM	4 µl
Iniciador Tb11	25 pmoles/µl	1 µl
Iniciador Tb12	25 pmoles/µl	1 µl
Taq DNA polimerase	5 U/µl	0,2 µl
Volume total	-	45 µl

4. Distribuir 45 µl da mistura em cada tubo teste.
5. Em outra sala, acrescentar 5 µl do DNA preparado previamente.
6. Colocar os tubos em um termociclador programado com os ciclos abaixo.

Ciclos programados em um termociclador

Desnaturação inicial	95°C	5 minutos
45 ciclos:		
Desnaturação	94°C	1 minuto
Anelamento	60°C	1 minuto
Extensão	72°C	1 minuto
Extensão final	72°C	10 minutos

Eletroforese para confirmar a amplificação

1. Preparar um litro de tampão TBE 0,5 x ou volume necessário para preparar o gel de agarose e encher a cuba de eletroforese.
2. Preparar o gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5 x. Misturar e dissolver a agarose em forno de microondas. Deixar esfriar até ± 50-60°C, distribuir na bandeja do sistema de eletroforese e colocar o pente. Quando a agarose estiver solidifi-

cada, colocar a bandeja na cuba de eletroforese, cobrir com tampão TBE 0,5 x e retirar o pente.

3. Em microtubos esterilizados de 1,5 ml, pipetar 5 µl do produto amplificado, acrescentar 2 µl da Solução de arraste em todos os tubos.
4. Aplicar o produto amplificado nos orifícios do gel de agarose.
5. Incluir em uma das linhas um marcador de 100 pb.
6. Iniciar a eletroforese a 5 V/cm até que o marcador azul da Solução de arraste atinja o final do gel.

Coloração do gel com brometo de etídio

ATENÇÃO: O Brometo de etídio é cancerígeno e deve ser manuseado com muito cuidado, usando luva e avental.

Todos os géis corados com Brometo de etídio e a solução que não for mais ser usada deverão ser descartados como resíduo químico ou tratados antes de serem desprezados.

1. Em uma cuba com tampa, colocar um litro de Água destilada e 1-2 gotas da Solução estoque do Brometo de etídio 0,5%.
2. Incubar o gel na Solução de Brometo de etídio por 10 minutos e depois colocá-lo em uma cuba contendo água, para remoção do excesso de Brometo de etídio, por mais 10 minutos. Observar sobre luz UV e documentar com sistema fotográfico. As amostras que apresentarem amplificação deverão ser digeridas com as enzimas de restrição *Hae* III e *Bst*E II.

Digestão dos produtos amplificados

1. Numerar em duplicata microtubos de 1,5 ml estéreis e deixá-los fechados até o momento do uso.
2. Em dois microtubos, preparar as misturas abaixo, utilizando o cálculo para o número de reações que serão realizadas.

Reagentes	BstEII	HaeIII
	1 reação	1 reação
Tampão 10x	1,5 µl	1,5 µl
Água	8,5 µl	7,5 µl
Enzima	1 µl	1 µl
Produto do PCR	4 µl	5 µl
Volume total	15 µl	15 µl

3. Incubar os tubos *BstE* II em banho-maria a $59 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 horas.
4. Incubar os tubos *Hae* III a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 horas.

Eletroforese dos produtos digeridos

1. Preparar o gel de agarose a 3%.
2. Misturar e dissolver a agarose em forno de microondas como descrito acima
3. Deixar esfriar até $\pm 50\text{-}60^\circ\text{C}$ e distribuir na bandeja do sistema de eletroforese e colocar o pente.
4. Quando a agarose estiver solidificada, colocar na cuba de eletroforese e cobrir com tampão TBE 0,5x. Retirar o pente.
5. Acrescentar 5 μl da Solução de arraste em todos os tubos com 15 μl do produto digerido e aplicar nos orifícios do gel de agarose conforme descrito abaixo.
6. No primeiro orifício aplicar marcador de 50 pb (M), seguida pelas amostras digeridas com *BstE* II. No próximo orifício aplicar novamente o marcador de 50pb seguida pelas amostras digeridas com a enzima *Hae* III e no último orifício marcador de 50 pb.

Exemplo:

<i>BstE</i> II						<i>Hae</i> III						
M	1	2	3	4	5	M	1	2	3	4	5	M

7. Iniciar a eletroforese a 5 V/cm (entre os eletrodos) até que o marcador azul da Solução de arraste atinja o final do gel.

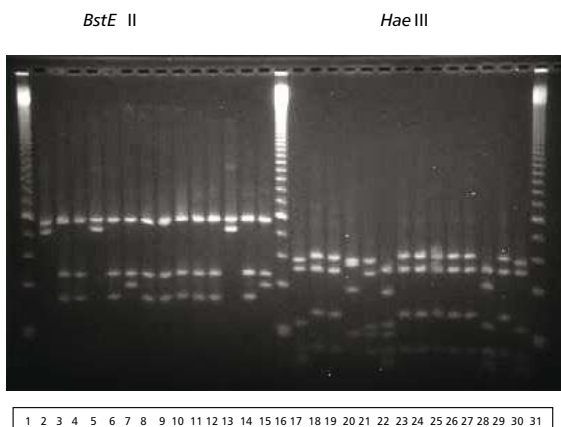
Coloração com Brometo de etídio

1. Incubar o gel na Solução de Brometo de etídio, preparada como descrito anteriormente, por 10 minutos e depois em água por 10 minutos.
2. Observar sobre luz UV e documentar com sistema fotográfico.

Leitura e Interpretação

1. Determinar o tamanho dos fragmentos obtidos, baseando-se no marcador de 50 pb aplicado em ambas as laterais e no meio do gel. Figura 4.
2. Anotar os resultados e comparar com o algoritmo descrito a seguir.

Figura 4. Gel de agarose contendo perfis de PRA após digestão com as enzimas de restrição *BstE* II e *Hae* III. Linhas 1, 16 e 31 = Marcador de peso molecular de 50pb. Amostras 2-15 digeridas com *BstE* II e amostras 17-30 digeridas com *Hae* III.



Fonte: Fotografia cedida por Erica Chimara

Controle de qualidade interno do método de PRA-*hsp65*

- Controle de qualidade da água purificada do tipo Milli-Q.
Esterilizar em autoclave a água a ser utilizada na extração do DNA e na reação do PCR. Fazer alíquotas de 500 µl em microtubos esterilizados em autoclave. Registrar e dar número ao lote conforme as regras da qualidade do laboratório. Antes de utilizar esse lote nas extrações de DNA e na PCR, realizar uma reação de PCR com um controle positivo contendo DNA e duas reações de controle negativo contendo amostra desse lote de água. Se não houver amplificação do controle negativo, esse lote de água está aprovado para uso.
- Controle da reação de PCR. A PCR, por ser um método bastante sensível, exige muitos cuidados para prevenção de contaminação da reação com produto de PCR de reações anteriores. Esse controle é muito importante para monitoramento de resultados falso positivos. Por essa razão, deve-se incluir em toda reação um tubo com os reagentes da reação e ao invés do DNA acrescentar água purificada do tipo Milli-Q esterilizada. Caso ocorra amplificação do controle contendo água, toda reação deverá ser repetida. Nesse caso, deve-se rever todo processo para identificar a origem da contaminação.
- Controle da digestão enzimática. O controle da efetividade das enzimas de restrição utilizada deve ser feito incluindo na reação de PCR uma amostra de DNA de uma cepa de referência com padrão de restrição conhecido. Incluir o produto da amplificação dessa cepa na etapa da digestão enzimática e aplicá-la no último orifício do gel de eletroforese. Se o padrão de restrição não corresponder ao esperado, essa etapa deverá ser repetida com um novo lote da enzima de restrição.

- d) Controle da eletroforese e coloração com Brometo de etídio. Para o controle da coloração dos produtos amplificados ou digeridos e da eletroforese, aplicar no último orifício do gel, um marcador de peso molecular de 50 ou 100 pb. A não visualização do marcador após a coloração indica que o processo de coloração não foi adequado. Nesse caso, pode se preparar uma nova Solução de Brometo de etídio e repetir a coloração.

A eletroforese estará aprovada se todas as bandas do marcador de peso molecular forem visualizadas separadamente no gel de agarose, como indicado pelo fabricante.

Tratamento de géis e da Solução de Brometo de etídio³⁰

Os géis corados e a Solução de Brometo de etídio podem ser descartados seguindo as normas de descarte de resíduos químicos ou fazer a descontaminação no próprio laboratório, com Permanganato de potássio. A solução corante pode ser inativada com carvão ativado. Proceder separadamente a inativação do Brometo de etídio contido nos géis e na solução de coloração.

1. Colocar os géis ou a Solução de Brometo de etídio em um Becker de 1000 ml. Quando o volume atingir a metade do recipiente acrescentar um pouco de água para reduzir a concentração do Brometo de etídio.
2. Adicionar um volume de 0,5 M de Permanganato de potássio (KMnO_4) (Anexo 8.12.25).
3. Misturar cuidadosamente e, então, adicionar um volume de HCl 2,5 N (Anexo 8.12.26). Deixar a solução em repouso por várias horas.
4. Adicionar um volume de NaOH 2,5 N (Anexo 8.12.27). Misturar cuidadosamente.
5. Descartar a solução na pia e os géis no lixo hospitalar.

Inativação da solução de BrEt com carvão ativado

1. Em uma garrafa rotulada, colocar um funil de vidro com filtro de papel e um pouco de carvão ativado.
2. Umedecer levemente o carvão com água.
3. Verter a solução corante cuidadosamente.
4. O líquido recolhido na garrafa deve ser desprezado na pia.
5. Abrir a torneira e deixar a água correr por alguns segundos.
6. O filtro com o carvão ativado pode ser utilizado 2 a 3 vezes.
7. Se o líquido filtrado apresentar coloração, o carvão deverá ser trocado.
8. O filtro com o carvão ativado deve ser colocado dentro de um saco de autoclave e embalado em uma caixa de papelão.
9. Fechar e rotular a caixa e descartar de acordo com as normas de descarte de resíduos químicos.

Algoritmo dos perfis de restrição de 441 pb do gene *hsp65* digeridos com as enzimas *BstE* II e *Hae* III

<i>BstE</i> II		<i>Hae</i> III	Espécie
440		170 – 130	<i>M. triviale</i> 1
		160 – 90 – 60	<i>M. vaccae</i> 1
		160 – 85 – 55	<i>M. flavescens</i> 3
		145 – 130	<i>M. lentiflavum</i> 1
		145 – 130	<i>M. simiae</i> 5
		140 – 55 – 50	<i>M. flavescens</i> 1
		130 – 115 – 70 – 60	<i>M. aurum</i> 2
		130 – 105 – 70	<i>M. szulgai</i> 1
320	130	200 – 70 – 60 – 55	<i>M. immunogenum</i> 2
		200 – 60 – 55 – 50	<i>M. chelonae</i> 1
		160 – 110	<i>M. haemophilum</i> 1
		145 – 70 – 60 – 55	<i>M. immunogenum</i> 1
		140 – 130 – 50	<i>M. elephantis</i> 1
		140 – 95 – 80	<i>M. cosmeticum</i> 1
		140 – 65 – 60	<i>M. mucogenicum</i> 1
	115	185 – 140	<i>M. terrae</i> 2
		180 – 130	<i>M. terrae</i> 1
		170 – 140	<i>M. neoaurum</i> 1
		145 – 130	<i>M. simiae</i> 4
		145 – 130 – 50	<i>M. triplex</i> 1
		145 – 130	<i>M. lentiflavum</i> 2
		140 – 90 – 60	<i>M. chitae</i> 1
		140 – 90 – 60	<i>M. nonchromogenicum</i> 2
		140 – 90 – 60	<i>M. mucogenicum</i> 3
		140 – 60 – 50	<i>M. terrae</i> 3
		130 – 115 – 60	<i>M. gordonae</i> 4
		130 – 110 – 70 – 60	<i>M. gordonae</i> 8
		130 – 95 – 75 – 60	<i>M. kansasii</i> 5
		125 – 105	<i>M. genavense</i> 1

210	200 – 70 – 60 – 50	<i>M. abscessus</i> 2
	200 – 70 – 60 -50	<i>M. bolletii</i> 1
	200 – 70 – 60 – 50	<i>M. massiliense</i> 1
	190 – 105 – 80	<i>M. ulcerans</i> 2
	200 – 70 – 55	<i>M. ulcerans</i> 2
	185 – 130	<i>M. simiae</i> 1
	180 – 135 -70 – 50	<i>M. thermoresistibile</i> 1
	180 – 100 – 50	<i>M. hassiacum</i> 1
	155 – 140	<i>M. simiae</i> 2
	145 – 140 – 100 – 50	<i>M. peregrinum</i> 1
	145 – 130 – 95	<i>M. scrofulaceum</i> 1
	145 – 130	<i>M. avium</i> 3
	145 – 130	<i>M. intermedium</i> 1
	145 – 130	<i>M. interjectum</i> 1
	145 – 130	<i>M. intracellulare</i> 3
	145 – 130	<i>M. simiae</i> 3
	145 – 105	<i>M. bohemicum</i>
	145 – 105 – 80	<i>M. malmoense</i> 2
	145 – 105 – 80	<i>M. ulcerans</i> 1
	145 – 105 – 80	<i>M. marinum</i> 1
	145 – 70 – 60 – 55	<i>M. abscessus</i> 1
	140 – 125 – 100 – 50	<i>M. porcinum</i> 1
	140 – 125 – 100 – 50	<i>M. peregrinum</i> 2
	140 – 105 – 80	<i>M. intracellulare</i> 2
	140 – 90 – 60	<i>M. obuense</i> 1
	140 – 80 – 60 – 50	<i>M. phlei</i> 1
	130 – 115	<i>M. gordonae</i> 5
	130 – 105	<i>M. avium</i> 1
	130 – 105	<i>M. avium sub paratuberculosis</i> 1
	130 – 105 – 80 – 60	<i>M. branderi</i> 1
	130 – 105 – 80	<i>M. kansasii</i> 1
	130 – 105 – 60	<i>M. avium</i> 2
	130 – 80 – 60	<i>M. celatum</i> 1
	120 – 115 – 110	<i>M. intracellulare</i> 4
	115 – 105	<i>M. asiaticum</i> 1

235	130/85	175 – 80	<i>M. aurum</i> 1
		160 – 90 – 60	<i>M. monacense</i>
		145 – 140 -100 – 60	<i>M. peregrinum</i> 3
		145 – 130	<i>M. simiae</i> 3
		145 – 130	<i>M. Sherrisii</i> 1
		145 – 125 – 60	<i>M. smegmatis</i> 1
		145 – 125 – 60	<i>M. wolinski</i> 1
		145 – 125 – 60	<i>M. mageritense</i> 1
		140 – 105 – 70	<i>M. shimoidei</i> 1
		140 – 120 – 95	<i>M. gordonae</i> 6
		130 – 105 – 80	<i>M. celatum</i> 2
		130 – 105 – 70	<i>M. gastri</i> 1
		130 – 105	<i>M. kansasii</i> 2
		130 – 105 – 70	<i>M. kansasii</i> 6
		130 – 95 – 70	<i>M. kansasii</i> 3
	100	160 – 115 – 60	<i>M. gordonae</i> 9
		155 – 110	<i>M. gordonae</i> 7
		160 – 105 – 60	<i>M. heckeshornense</i> 1
		145 – 130	<i>M. lentiflavum</i> 3
		145 – 130 – 60	<i>M. intracellulare</i> 1
		145 – 105 – 80	<i>M. malmoense</i> 1
		140 – 60	<i>M. hibernae</i> 1
		130 – 115	<i>M. gordonae</i> 3
		130 – 110 – 95	<i>M. gordonae</i> 10
	120	215 – 110	<i>M. gordonae</i> 2
		160 – 115 – 60	<i>M. gordonae</i> 1
		165 – 105 – 60	<i>M. xenopi</i> 1
		150 – 130 – 70	Complexo <i>M. tuberculosis</i> 1
		145 – 60 – 55	<i>M. nonchromogenicum</i> 1
		145 – 120 – 60 – 55	<i>M. fortuitum</i> 1
		145 – 120 – 60 – 55	<i>M. fortuitum sub.acetamidolyticum</i>
		140 – 125 – 60 – 55	<i>M. farcinogenes</i> 1
		140 – 125 – 60 -50	<i>M. senegalense</i> 1
		135 – 90 – 85	<i>M. fortuitum</i> 3
	85	130 – 115 – 75 – 60	<i>M. kansasii</i> 4
		130 – 95	<i>M. lentiflavum</i> 4

Fonte: Praside <http://app.chuv.ch/praside/index.html>

8.9 Testes fenotípicos e moleculares combinados

Descrição

Tanto o método fenotípico como o PRA-*hsp65* apresentam algumas limitações. As principais limitações do método fenotípico consistem na demora para obtenção de resultados e a dificuldade de diferenciação de diversas espécies. Alguns testes bioquímicos podem apresentar resultados duvidosos, mesmo utilizando-se controles de

qualidade adequados. Para obtenção do resultado final de identificação pelo método fenotípico, deve-se considerar o conjunto de todos os testes.

As principais limitações do método de PRA-*hsp65* consistem no fato de que algumas espécies apresentam perfil de PRA ainda não descrito na literatura ou um perfil de PRA compartilhado por mais de uma espécie.

Por isso, a combinação de ambos facilita e evita alguns erros na identificação de espécies (Figura 1).

Para não causar uma demora no resultado, recomenda-se realizar simultaneamente o PRA-*hsp65* e alguns testes fenotípicos, de acordo com os passos abaixo.

- 1) Avaliação das características culturais como morfologia e pigmentação das colônias (cultura original).
- 2) Avaliação microscópica da morfologia dos bacilos (cocobacilos, bacilos curtos, longos, formação de corda).
- 3) Preparo da suspensão bacteriana para inóculo nos testes: a) inibição de crescimento em meio contendo PNB, NaCl 5%, ácido pícrico; b) crescimento em meio de agar comum; c) avaliação das temperaturas de crescimento e pigmentação.
- 4) Extração do DNA bacteriano e PRA-*hsp65*.

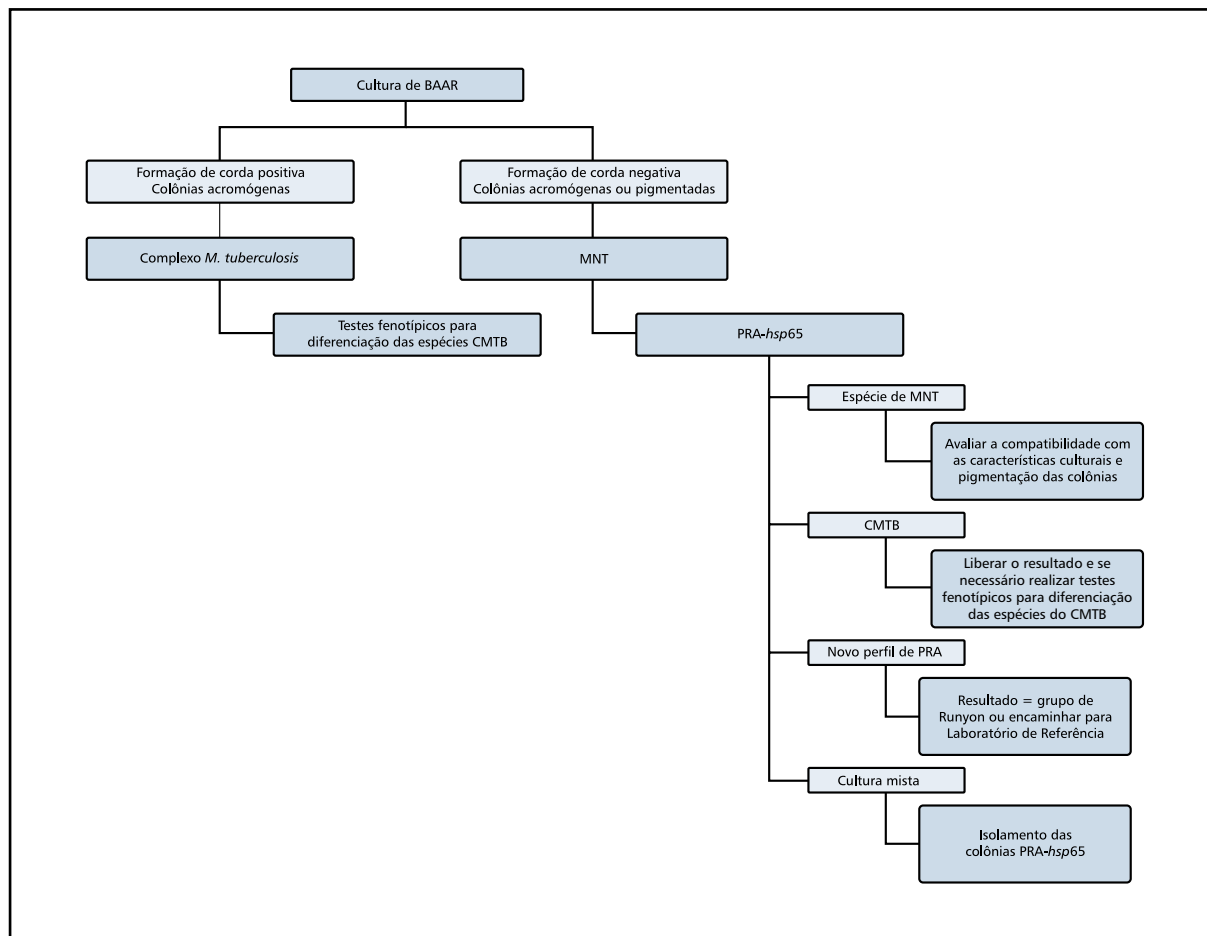
Interpretação dos resultados

O resultado da identificação poderá ser liberado se a espécie identificada pelo PRA apresentar as características culturais (morfologia e pigmentação) compatíveis com a tabela de identificação fenotípica. Caso os resultados não sejam compatíveis, aguardar o resultado das provas em andamento e se for necessário, realizar outras provas ou encaminhar a cultura para um Laboratório de Referência (LR).

A cultura mista composta por duas espécies de micobactérias causa erros na identificação. Às vezes, mas nem sempre, a presença de duas espécies pode ser detectada pelo PRA ou nas subculturas em LJ. Nesse caso, a cultura deve ser subcultivada a partir de diluições da suspensão bacteriana, a fim de se obter colônias isoladas. Repetir novamente todo o processo a partir das subculturas das colônias isoladas.

Em alguns casos, mesmo utilizando vários métodos fenotípicos e moleculares não se chega a uma identificação conclusiva. Nesse caso, pode se liberar o resultado baseado na classificação de Runyon. Vale lembrar a importância da manutenção das cepas congeladas para eventuais repetições dos testes.

Figura 5 Fluxograma para identificação de micobactérias pela combinação de métodos fenotípicos e moleculares



8.10 Considerações sobre critérios para diagnóstico de doença causada por MNT

O diagnóstico de doença por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento a partir de espécimes clínicos não estéreis pode significar colonização transitória ou contaminação. A American Thoracic Society recomenda que o diagnóstico dessas doenças seja feito com base em uma série de critérios bacteriológicos, clínicos e radiológicos². Por essa razão, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica.

8.11 Referências

1. BROSCHE, R.; GORDON, S.V.; MARMESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L.M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; van SOOLINGEN, D.; COLE, S. *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 3684-3689, 2002.
2. GRIFFITH, D.E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S.M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G.; IADEMARCO, M.F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; von REYN, C.F.; WALLACE, R.J. Jr, WINTHROP, K.; *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 15;175(4):367-416, 2007.
3. COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. *Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice*. Butter Worth-Heinemann, Oxford, 2nd edition. 139 p, 1997.
4. LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S. Portaels. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*. Brugges, Vanden Broelle, 164 p. 2004.
5. MONTEIRO, P.H.T.; MARTINS, M.C.; UEKI, S.Y.M.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; TELLES, M.A.S. *Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex*. Braz J Microbiol, 34: 171-174, 2003.
6. INUMARO, V.T.G.; BLANCO, R.M.; MARTINS, M.C.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; UEKI, S.Y.M.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; TELLES, M.A. *Culturas Mistas de micobactérias: é importante isolar e identificar?*. Rev Inst Adolfo Lutz, 64:137-41, 2005.
7. HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T.; *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 597-603, 1994.
8. TSUKAMURA, M.; TSUKAMURA, S. *Differentiation of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis by p-nitro-benzoic acid susceptibility*. Tubercle, 45: 64-65, 1964.
9. TSUKAMURA, M. *Identification of Mycobacteria*. Mycobacteriosis Research Laboratory of the National Chubu Hospital, Aichi, Japan, 1984.
10. KENT, P.T.; KUBICA, G.P.; *Public Health Mycobacteriology. A guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control, Atlanta, 1985.
11. DAVID, H.; LEVY-FLEBAULT, V.; THOREL, M.F. *Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique*. Institut Pasteur, Paris, 1989.
12. DAVID H.; BRUM, L.; PRIETO, E. *Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa, 1994.

13. FERNÁNDEZ, de Vega F.A.; MORENO, J.E.; MARTÍN, J.G.; GUTIÉRREZ, J.J.P. *Procedimentos em Microbiologia Clínica*. Recomendaciones de la Sociedade española de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica: Micobactérias. 2005. disponível em <<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/>> Acesso em 14 mar 2006.
14. van SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; de HAAS P.E.; HERMANS, P.W.; KOEDAM, M.A.; TEPPEMA, K.S.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L.M.; van EMBDEN, J.D. *A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, 47:1236-45, 1997.
15. EUZÉBY, J.P. *List of bacterial names with standing in nomenclature*. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>) Acesso em 09 mar 2007.
16. van SOOLINGEN, D.; van der ZANDEN, A.G.; de HAAS, P.E.; NOORDHOEK, G.T.; KIERS, A.; FOUODRAINE, N.A.; PORTAELS, F.; KOLK, A.H.; KREMER, K.; van EMBDEN, J.D. *Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers*. *J Clin Microbiol*, 36:1840-5, 1998.
17. YATES, M.D. *The differentiation and epidemiology of the tubercle bacilli and a study into the identification of other mycobacteria*. MPhil Thesis: University of London, 1984.
18. FROTA, C.C.; HUNT, D.M.; BUXTON, R.S.; RICKMAN, L.; HINDS, J.; KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; COLSTON, M.J. *Genome structure in the vole bacillus, Mycobacterium microti, a member of the Mycobacterium tuberculosis complex with a low virulence for humans*. *Microbiology*, 150:1519-27, 2004.
19. MILTGEN, J.; MORILLON, M.; KOECK, J.L.; VARNEROT, A.; BRIANT, J.F.; NGUYEN, G.; VERROT, D.; BONNET, D.; VINCENT, V. *Two cases of pulmonary tuberculosis caused by Mycobacterium tuberculosis subsp canetti*. *Emerg Infect Dis*, 8:1350-2, 2002.
20. ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLAZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain*. *Int J Syst Bacteriol*, 49:1263-73, 1999.
21. ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. *Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1785-9, 2003.
22. COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. *Tuberculosis in seals caused by a novel*

- member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 53:1305-14, 2003.
23. MAC FADDIN, J.F. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1980.
 24. RUNYON, E.H. *Anonymous mycobacteria in pulmonary disease*. Med Clin North Am, 43:273-290, 1959.
 25. BRASIL. Ministério da Saúde. SVS., Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 3 ed. 2005.
 26. TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. *Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis*. J Clin Microbiol, 31: 175-178, 1993.
 27. BRUNELLO, F.; LIGOZZI, M.; CRISTELLI, E.; BONORA, S.; TORTOLI, E.; FONTANA, R. *Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene*. J Clin Microbiol, 39: 2799-806, 2001.
 28. DEVALLOIS, A.; GOH, K.S.; RASTOGI, N. *Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species*. J Clin Microbiol, 35: 2969-2973, 1997.
 29. CHIMARA, E. *Avaliação de métodos moleculares para identificação de micobactérias e elaboração de um algoritmo de identificação 2005*. Tese de Doutorado, apresentada a Universidade Federal de São Paulo.
 30. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory Press. 2nd edition. 1989.

8.12 Anexos do capítulo

8.12.1 Meio de Löwenstein Jensen com hidrazida do ácido 2-tiofeno carboxílico (TCH) na concentração final de 5 µg/ml

Pesar 50 mg de TCH e adicionar a 5 ml de Água destilada estéril. Transferir 1 ml dessa solução para um tubo com 9 ml de Água destilada estéril. Adicionar 1 ml dessa solução a 100 ml meio LJ. Distribuir 3 ml em tubos com tampa de rosca 12 x 120 mm. Coagular o meio, colocando os tubos inclinados, a 85°C por 45 minutos. Incubar a 36°C ± 1°C por 24 horas para a prova de esterilidade. Validade: 2 meses.

8.12.2 Meio de Löwenstein Jensen com estreptomicina (SM) na concentração final de 2 µg/ml

Pesar 0,1 g de SM e dissolver em 10 ml de Água destilada estéril. Transferir 1 ml dessa solução para um tubo com 9 ml de Água destilada estéril. Adicionar 0,2 ml dessa diluição em 100 ml de meio LJ. Distribuir 3 ml de meio em tubos de rosca 12 x 120 mm. Coagular o meio, colocando os tubos inclinados a 85°C por 45 minutos. Incubar a 36°C ± 1°C por 24 horas para a prova de esterilidade. Validade: 2 meses.

8.12.3 Meio de Löwenstein Jensen com cicloserina (CS) na concentração final de 20 µg/ml

Pesar 0,1 g de CS e dissolver em 10 ml de Água destilada estéril. Adicionar 0,3 ml dessa solução em 100 ml de meio LJ. Distribuir 3 ml em tubos de rosca 12 x 120 mm. Coagular o meio, colocando os tubos inclinados a 85°C por 45 minutos. Incubar a 36°C ± 1°C por 24 horas para a prova de esterilidade. Validade: 2 meses.

8.12.4 Meio de Kirchner com 0,1% de Agar

Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	19,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	2,5 g
Asparagina	5,0 g
Citrato trissódico	2,5 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,6 g
Glicerol	20,0 ml
Solução aquosa de vermelho fenol 0,4% (P/V)	3,0 ml
Agar	1,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml
pH 7,4 – 7,6	

Aquecer para dissolver os reagentes e ajustar o pH. Distribuir 10 ml em tubos 20 x 100 mm. Esterilizar em autoclave a 115°C por 10 minutos. Manter em geladeira. No momento de uso adicionar em cada tubo 1 ml de soro de cavalo estéril ou o enriquecimento Middlebrook OADC. Validade: 2 meses.

8.12.5 Meio para o teste da pirazinamidase

Meio de Dubos desidratado	6,5 g
Água destilada	1000 ml
Pirazinamida	0,1 g
Piruvato de sódio	2,0 g
Agar	15 g

Dissolver o meio desidratado de Dubos em Água destilada; adicionar a pirazinamida, o piruvato de sódio e o agar. Aquecer até dissolver o agar e distribuir 5 ml em tubos de 16 x 125 mm com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Retirar da autoclave e deixar os tubos na posição vertical até solidificar o agar. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para a prova de esterilidade. Conservar em geladeira. Validade: 2 meses.

8.12.6 Solução de Sulfato Ferroso Amoniacal a 1%

Preparar a solução no momento de uso. Dissolver 0,1 g de Sulfato Ferroso amoniacal em 10 ml de Água destilada estéril. Para facilitar o trabalho, alíquotas de 0,1 gramas de Sulfato Ferroso amoniacal podem ser estocadas e colocadas em tubos estéreis de 16 x 125 mm com tampa de rosca. No momento de uso é só adicionar 10 ml de Água destilada estéril.

8.12.7 Substrato de nitrato de sódio 22 mM, pH 7,0

Nitrato de sódio (NaNO_3)	0,85 g
Fosfato dipotássico (KH_2PO_4)	1,17 g
Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	4,85 g
Água destilada	1000 ml
Ajustar o pH 7,0. Distribuir em vários frascos ou balões. Esterilizar em autoclave a 121° por 15 minutos. Validade: 6 meses sob refrigeração.	

8.12.8 Reagentes de revelação do teste redução do nitrato

Reagente A

HCl	50 ml
Água destilada estéril	50 ml
Atenção: Adicionar lentamente o HCl na água, nunca adicione água ao ácido. Validade: 2 meses sob refrigeração	

Reagente B

Sulfanilamida	0,2 g
Água destilada estéril	100 ml
Validade: 2 meses sob refrigeração. Descartar se o reagente apresentar mudança de cor ou formação de precipitado.	

Reagente C

Hidrocloridrato N-naftiletilenodiamina	0,1 g
Água destilada estéril	100 ml
Validade: 2 meses sob refrigeração. Descartar se o reagente apresentar mudança de cor ou formação de precipitado	

Escala padrão de cores para leitura do teste de redução do nitrato

Preparar as seguintes soluções estoque:

1 – Fosfato dissódico 0,067 M

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	0,95 g
Água destilada estéril q.s.p	100 ml

2 – Fosfato monopotássico 0,067 M

Fosfato monopotássico KH_2PO_4	0,91 g
Água destilada estéril q.s.p	100 ml

3 – Fosfato trissódico 0,067 M

Fosfato trissódico ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2,55 g
Água destilada estéril q.s.p	100 ml

4 – Fenolftaleína 1%

Fenolftaleína	1,0 g
Álcool etílico 95°	100 ml

5 – Azul de bromotimol 1%

Azul de bromotimol	1,0 g
Álcool etílico 95°	100 ml

6 – Azul de bromotimol 0,01%

Solução estoque 5	1,0 ml
Água destilada estéril	100 ml

Substrato:

Solução estoque 1	35 ml
Solução estoque 2	5 ml
Solução estoque 3	100 ml

Procedimento

Colocar numa estante 8 tubos com tampas de rosca 12 x 120 mm e numerá-los de 1 a 8. Distribuir 2 ml do substrato nos tubos 2 a 8.

Escala:	
Substrato	10 ml
Solução estoque 4	0,1 ml
Solução estoque 6	0,2 ml

Transferir 2 ml desta solução para o tubo nº 1 e 2 ml para o tubo nº 2. Do tubo nº 2 transferir 2 ml para o tubo nº 3 depois de homogeneizar, e assim sucessivamente até o tubo nº 8, desprezando os 2 ml excedentes deste último tubo. Descartar os tubos de nº 4 e nº 7. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Lacrar e conservar em geladeira.

A escala padrão de leitura para o teste de redução do nitrato vai da cor rosa pálido a vinho e corresponde a:

- tubo nº 8 (+/-)
- tubo nº 6 (1+)
- tubo nº 5 (2+)
- tubo nº 3 (3+)
- tubo nº 2 (4+)
- tubo nº 1 (5+)

8.12.9 Solução de Uréia-indol para o Teste da Uréase (pH final 7,0)

L-triptofano	3 g
Fosfato dipotássico (KH_2PO_4)	1 g
Fosfato monopotássico (K_2HPO_4)	1 g
Cloreto de sódio (NaCl).	5 g
Álcool etílico 95°	10 ml
Solução de vermelho de fenol 0,2%	12,5 ml
Solução de uréia 20% estéril	100 ml
Água destilada	900 ml

Dissolver os componentes (exceto a solução de uréia) aquecendo levemente sem ferver. Deixar esfriar e ajustar o pH para 7,0. Filtrar em papel de filtro, distribuir em frascos de 50 ml, lacrar e identificar. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após esfriar, adicionar, com assepsia, 100 ml de solução de uréia 20% (20 g de uréia em 100 ml de Água destilada, esterilizar por filtração com membrana de 0,22 μ). Distribuir 1,5 ml em tubos estéreis de 12 x 120mm com tampa de rosca. Conservar em geladeira ao abrigo da luz. Validade: 2 meses.

8.12.10 Meio agar comum

Preparar o agar comum de acordo com recomendações do fabricante. Distribuir 4 ml em tubos com tampa de rosca (12 x 120 mm). Esterilizar em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Inclinar os tubos em bandejas até solidificação. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para a prova de esterilidade. Validade: 2 meses.

8.12.11 Meio de Sauton com Ácido Pírico 0,2% (pH final 7,0)

Glicerina	6 ml
KH_2PO_4	0,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Ácido cítrico	0,4 g
Citrato férrico amoniacal	0,01 g
Glutamato de sódio	0,8 g
Agar	4 g
Ácido pírico	0,4 g
Água destilada	194 ml

Dissolver os componentes, exceto o agar, por aquecimento. Resfriar e ajustar o pH com KOH 10% para 7,0. Acrescentar o agar e levar ao fogo para fundir. Distribuir 3 ml em tubo 12 x 120 mm, com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121° C, por 15 minutos. Inclinar os tubos em bandejas até solidificação. Realizar o teste de esterilidade, colocando os meios na estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Validade 2 meses sob refrigeração.

8.12.12 Meio de LJ com Cloreto de sódio 5%

Base de LJ	200 ml
Cloreto de sódio	10 g
Adicionar o cloreto de sódio na base de LJ e misturar bem. Colocar os tubos inclinados no coagulador a 80-85°C por 45 minutos. Realizar o teste de esterilidade, colocando os meios já coagulados na estufa a 36 ± 1°C por 24 horas. Validade 2 meses sob refrigeração.	

8.12.13 Substrato para o Teste da Arilsulfatase 3 e 14 dias**Meio líquido**

Preparar em duas garrafas ou balões os seguintes meios:

- 180 ml de meio líquido Dubos (ou Middlebrook 7H9) – teste dos 3 dias.
- 180 ml de meio líquido Dubos (ou Middlebrook 7H9) – teste dos 14 dias.

Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, adicionar 20 ml de enriquecimento Bacto Dubos Medium Albumin (ou o enriquecimento Middlebrook ADC) em cada um.

Solução substrato 0,08 M de dissulfato tripotássico de fenolftaleína

Dissulfato tripotássico de fenolftaleína	2,6 g
Água destilada estéril	50 ml
Esterilizar por membrana filtrante de 0,22 µm. Validade: 3 meses sob refrigeração.	

Meio para o teste de 3 dias

Meio líquido Dubos ou Middlebrook 7H9	180 ml
Solução de dissulfato tripotássico de fenolftaleína 0,08 M.	2,5 ml
Distribuir 2 ml em tubos de 12 x 120 mm com tampa de rosca, estéreis. Identificar os tubos (A3) dias. Validade: 2 meses sob refrigeração.	

Meio para o teste de 15 dias

Meio líquido Dubos ou Middlebrook 7H9	180 ml
Solução de Dissulfato Tripotássico de Fenolftaleína 0,08 M.	7,5 ml
Distribuir 2 ml em tubos de 12 x 120 mm com tampa de rosca, estéreis. Identificar os tubos (A15) dias. Validade: 2 meses sob refrigeração.	

8.12.13.1 Solução Reveladora – Carbonato de Sódio 2 N

Carbonato de sódio anidro (Na ₂ CO ₃)	10,6 g
Água destilada estéril	100 ml
Validade: 3 meses à temperatura ambiente	

8.12.14 Solução Substrato para Teste do Tween 80

Tampão Fosfato 0,067 M,	100 ml
Tween 80	0,5 ml
Solução aquosa de vermelho neutro a 0,1%.	2 ml
Adicionar o Tween 80 no Tampão Fosfato até completa dissolução, acrescentar o vermelho neutro. Distribuir 2 ml em tubos de 12 x 120 mm com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. O substrato deve ter cor âmbar após a esterilização. Manter em geladeira ao abrigo da luz envolvido em papel alumínio. Validade: 2 semanas.	

Tampão Fosfato 0,067 M – pH 7,0

Solução A – Fosfato de sódio M/15

Fosfato de sódio (Na_2HPO_4)	9,47 g
Água destilada	1000 ml
Dissolver o sal na água, esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos. Validade 6 meses.	

Solução B – Fosfato de Potássio M/15

Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	9,07 g
Água destilada	1000 ml
Dissolver o sal na água, esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos. Validade 6 meses.	

Tampão Fosfato 0,067 M – pH 7,0

Solução A	61,1 ml
Solução B	38,9 ml
Ajustar o pH da solução final para 7,0. Validade 6 meses.	

8.12.15 Meio de Dubos modificado para o Teste da β -galactosidase

Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	2,48 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,0 g
Asparagina	2,0 g
Citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1,5 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,6 g
Solução tween 80 10%	5,0 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Dissolver todos os reagentes na água. Preparar alíquotas de 100 ml. Esterilizar em autoclave a 115°C por 15 minutos. Manter em refrigerador. Validade: 3 meses.

Substrato para β -galactosidase

Dissolver 0,1g de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo em 20 ml do meio de Dubos modificado esterilizado. Esterilizar por membrana filtrante de 0,22 μm . Completar o volume para 100 ml com o meio de Dubos modificado esterilizado. Adicionar 7,5 ml do enriquecimento de Middlebrook OADC. Distribuir 2 ml em tubos estéreis de 12 x 120 mm com tampa de rosca. Manter em refrigerador. Validade: uma semana.

8.12.16 Solução de Telurito de Potássio 0,2%

Telurito de potássio	0,1 g
Água destilada	50 ml
Preparar alíquotas de 2 ml em tubos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 115°C por 15 minutos. Validade 2 meses sob refrigeração.	

8.12.17 Meio base para os Testes de Utilização de Inositol, Manitol, Citrato de Sódio

Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	1,05 g
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,2 g
Agar	8 g
Água destilada	400 ml
Dissolver em Água destilada todos os ingredientes. Aquecer até completa dissolução do agar. Dividir em quatro alíquotas de 100 ml. Ajustar o pH para 7,0 em duas alíquotas e pH 7,2 em outras duas. Esterilizar em autoclave a 121°C, por 20 minutos. Validade 2 meses à temperatura ambiente.	

8.12.18 Meio Controle – pH 7,0

Meio base pH 7,0	100 ml
Distribuir 3 ml em tubos 12 x 120 mm com tampa de rosca estéreis. Deixar o meio se solidificar com os tubos em posição inclinada. Validade 2 meses sob refrigeração.	

8.12.19 Meio com Citrato de Sódio – pH 7,0

Meio base pH 7,0	100 ml
Solução de citrato de sódio	5 ml
Fundir o meio base em forno de microondas ou em banho-maria até a temperatura aproximada de 56°C. Adicionar assepticamente 5 ml da solução de citrato de sódio, preparada previamente. Distribuir 3 ml em tubos estéreis 12 x 120 mm com tampa de rosca estéreis. Deixar o meio se solidificar com os tubos em posição inclinada. Validade 2 meses sob refrigeração.	

8.12.20 Meio com Manitol – pH 7,2

Meio base pH 7,2	100 ml
Solução de Manitol	5 ml
Fundir o meio base em forno de microondas ou em banho-maria até a temperatura aproximada de 56°C. Adicionar assepticamente 5 ml das Solução de Manitol, preparada previamente. Distribuir 3 ml em tubos estéreis 12 x 120 mm com tampa de rosca estéreis. Deixar o meio se solidificar com os tubos em posição inclinada. Validade 2 meses sob refrigeração.	

8.12.21 Meio com Inositol– pH 7,2

Meio base pH 7,2	100 ml
Solução de inositol	5 ml
Fundir o meio base em forno de microondas ou em banho-maria até a temperatura aproximada de 56°C. Adicionar assepticamente 5 ml das Solução de Inositol preparada previamente. Distribuir 3 ml em tubos estéreis 12 x 120 mm com tampa de rosca estéreis. Deixar o meio se solidificar com os tubos em posição inclinada. Validade 2 meses sob refrigeração.	

Solução de Inositol ou Manitol 0,5%

Inositol ou manitol	1,5 g
Água destilada estéril	15 ml
Dissolver o inositol ou manitol em água. Filtrar em membrana 0,22 µm. Manter em frasco bem vedado, para evitar evaporação. Validade 6 meses sob refrigeração.	

Solução Citrato de Sódio 0,6%

Citrato de sódio	1,8 g
Água destilada estéril	15 ml
Dissolver o Citrato de sódio em água. Filtrar em membrana 0,22 µm. Manter em frasco bem vedado, para evitar evaporação. Validade 6 meses sob refrigeração.	

8.12.22 Tampão TBE 10X (pH 8,0)

Tris base	107,8 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA 2H ₂ O	7,4 g
Água destilada	1000 ml
Ajustar o pH. Validade: 6 meses à temperatura ambiente	

8.12.23 Tampão de Arraste

Ficoll	1,5 g
Azul de bromofenol	0,025 g
Água destilada estéril	10 ml
Dissolver os reagentes em água. Manter em frasco escuro. Validade: 6 meses à temperatura ambiente.	

8.12.24 Solução de Brometo de Etídio

Brometo de etídio	50 mg
Água destilada esterilizada	10 ml
Diluir o brometo de etídio em Água destilada. No momento de uso, diluir duas a três gotas desta solução em dois litros de Água destilada. Manter em frasco escuro. Validade: 1 ano a temperatura ambiente. OBS. O Brometo de etídio é cancerígeno e deve ser manuseado com cuidado, utilizando todos os EPIs.	

8.12.25 Solução de Permanganato de Potássio 0,5 M

Permanganato de Potássio (KMnO_4)	79,02 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000 ml
Dissolver o KMnO_4 na água. Validade: 6 meses à temperatura ambiente.	

8.12.26 Solução de HCl 2,5 N

Ácido clorídrico P.A.	207 ml
Água destilada estéril q.s.p.	1000 ml
Lentamente adicionar o ácido clorídrico na água destilada. Validade: 6 meses à temperatura ambiente.	

8.12.27 Solução de NaOH 2,5 N

Hidróxido de sódio (NaOH) P.A.	100 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000 ml
Dissolver o NaOH na água. Validade: 6 meses à temperatura ambiente.	

TESTE DE SENSIBILIDADE PARA MICOBACTÉRIAS

9.1 Descrição

O Teste de Sensibilidade (TS) é o exame laboratorial realizado para detectar a resistência/sensibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. Resistência às drogas antituberculose é definida pelos resultados dos testes bacteriológicos, como a diminuição da sensibilidade *in vitro* de um isolado de *M. tuberculosis* comparado a um isolado que nunca entrou em contato com a droga¹.

Os casos de tuberculose resistentes às drogas têm aumentado em todo o mundo e constituem atualmente um grave problema, associados aos fatores relacionados com o paciente, com o sistema de saúde e com os fatores contextuais. Em muitos países, os fatores que afetam negativamente o Programa de Controle da Tuberculose (PCT) incluem a falta de um esquema terapêutico padronizado, a deficiência na sua implementação e manutenção, escassez no fornecimento das drogas em áreas com inadequados recursos ou instabilidade política. O uso de drogas antituberculose de baixa qualidade é uma preocupação adicional. O desenvolvimento de resistência pode envolver também uma seleção inapropriada do esquema terapêutico, algumas vezes devido ao desconhecimento de um tratamento anterior, à ignorância sobre a importância de esquemas padronizados e aos erros como prescrição de uma única droga. Outro fator importante é a não adesão do paciente ao tratamento prescrito. A frequência da resistência às drogas é um indicador da qualidade do PCT, pois evidencia a ausência de um sistema organizado para assegurar um rápido diagnóstico, um tratamento eficiente e uma supervisão ao tratamento do doente^{2,3}.

9.2 Vigilância da resistência às drogas

A vigilância da resistência às drogas é feita através de pesquisas, chamadas inquéritos epidemiológicos de resistência. Esses estudos têm o objetivo de medir a prevalência da resistência às drogas do tratamento da TB, utilizando protocolos epidemiológicos e laboratoriais padronizados, fazendo uma correlação entre as taxas de resistência e o controle do tratamento da TB.

De acordo com o protocolo do II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em Tuberculose no Brasil, resistência primária é definida como a presença de organismos resistentes a uma ou mais drogas em pacientes que nunca foram tratados para TB ou que foram tratados por menos de um mês. Resistência adquirida é definida como a presença de organismos resistentes a uma ou mais drogas em pacientes tratados para TB por um mês ou mais, sendo que estão inclusos os casos de recidiva, de retorno após abandono e de falência de tratamento. Os casos de resistência a isoniazida e rifampicina, com ou sem resistência a outra droga antituberculose são definidos, como tuberculose multirresistente (TBMR)⁴.

Desde 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) vêm realizando um Projeto Global de Vigilância da Resistência às Drogas do Tratamento da Tuberculose em todo o mundo. Os resultados do estudo mostraram que o *M. tuberculosis* resistente está presente em todas as áreas geográficas estudadas e também apontaram para o problema de TBMR em regiões do Leste Europeu onde a prevalência é maior que 3% entre os casos novos de TB¹.

O Brasil participou do primeiro estudo mundial com uma amostra representativa, de 5.138 amostras, oriundas de pacientes atendidos ambulatorialmente, sendo 866 com tratamento anterior para TB e 4.272 sem tratamento prévio. Considerando a resistência a qualquer droga, a taxa de resistência primária foi de 8,5% (INH 4,4%, RMP 1,3%, EMB 0,1% e SM 0,2%) e a taxa de resistência adquirida foi de 21% (INH 11,3%, RMP 6,6%, EMB 0,1% e SM 0,8%). Considerando a TBMR, a taxa de resistência primária foi de 1,1% e de 7,9% para a resistência adquirida⁵.

O segundo estudo global de resistência, realizado entre 1996 e 1999, completou uma cobertura mundial de 33% da população e de 28% dos casos de TB. Os resultados mostraram que o problema da TBMR persiste em algumas áreas geográficas do mundo. A análise dos resultados dos dois estudos indica que as taxas médias de TBMR primária e adquirida não modificaram significativamente, indicando que as taxas de multirresistência preocupam porque são elevadas, alertando para a necessidade de incrementar ações de prevenção e tratamento nessas áreas⁶.

O terceiro estudo foi realizado entre 1999 e 2002 e os dados confirmam a concentração geográfica de TBMR na Europa Oriental e Ásia Central, onde 79% de TBMR são resistentes a pelo menos três das quatro principais drogas usadas no tratamento de primeira linha, e coincide com o rápido aumento das taxas de incidência de HIV entre essa população⁷.

Até o momento, os estudos globais de resistência (de 1994 a 2002) abrangeram cerca de um terço dos casos notificados de TB no mundo. Entretanto, grandes lacunas ainda são encontradas em áreas cruciais, que necessitam serem estudadas, como China, Índia e países da antiga União Soviética. Em vários locais, novos estudos estão sendo realizados. O Brasil, que participou do primeiro inquérito, está realizando um novo estudo de resistência, com amostragem de novos casos e de retratamento, sendo que pacientes com TB e HIV também serão incluídos⁷.

9.3 Mecanismo de resistência

Em Microbiologia Médica, o mecanismo mais freqüente de resistência é a presença de plasmídeos de genes que controlam a síntese de enzimas modificadoras dos antibióticos que os tornam inativos na sua ação antibacteriana. No caso do *M. tuberculosis*, não há indicação de uma transferência horizontal de genes, isto é, aquisição

de resistência por plasmídeos ou transposons e o mecanismo de resistência é exclusivamente por mutações. No caso de outras micobactérias (MNT), a maioria apresenta uma resistência natural a todas as drogas, provavelmente devido à estrutura da parede celular, que atuaria como uma barreira. Assim, no estudo das resistências, temos que considerar a tuberculose separadamente das outras micobacterioses^{8,9}.

O mecanismo clássico pelo qual a mutação confere resistência é aquele que ocorre no gene que codifica para o alvo da droga, diminuindo a habilidade desta se ligar à enzima. A mutação pode inibir uma enzima que transforma a droga que é inativa em droga ativa contra a micobactéria. Outro tipo de mutação não altera a proteína-alvo, mas simplesmente aumenta sua expressão, havendo assim maior quantidade de proteína do que a droga é capaz de inibir. Há um tipo de mutação que também pode produzir resistência, diminuindo o acúmulo da droga dentro da célula, quer por dificultar sua entrada ou por acelerar sua remoção da célula. A modificação química que inativa a droga também é um mecanismo de resistência^{8,9}.

Durante a infecção, nas cavidades pulmonares, a população é de 10^7 a 10^9 bacilos. Todos os bacilos que formam uma colônia, apesar de se originarem de uma única célula, não apresentam um comportamento homogêneo frente a todas as drogas anti-tuberculose. Em toda a população de bacilos sensíveis existe uma pequena proporção de bacilos (cerca de um a cada 10^8 bacilos, por geração), que sofreram mutações espontâneas e se comportam como resistentes a alguma das drogas^{9,10}.

As mutações que levam à resistência no *M. tuberculosis* ocorrem espontaneamente e ao acaso, sendo, portanto, importante conhecer a proporção de mutantes que se espera obter numa população de bacilos e a taxa de mutação para as drogas usadas no tratamento da tuberculose para uma melhor interpretação dos testes laboratoriais de sensibilidade. As mutações genéticas do *M. tuberculosis* que levam a resistência à RMP ocorrem numa taxa de 10^{-10} mutações por divisão celular e levam a uma prevalência estimada de 1 em cada 10^8 bacilos, em ambiente sem a droga. A taxa para INH é de aproximadamente 10^{-7} a 10^{-9} , resultando em resistência em 1 a cada 10^6 bacilos. Portanto, a “resistência genética” (mutações espontâneas) ocorre mesmo na ausência da exposição antimicrobiana, e é diluída pela maioria das micobactérias sensíveis. A presença de antimicrobianos fornece uma pressão seletiva para os organismos resistentes tornarem-se predominantes, especialmente em pacientes com uma grande carga de bacilos, isto é, com uma extensa lesão cavitária. Portanto, a resistência às drogas em tuberculose é o resultado da inter-relação do fenômeno da mutação espontânea e da seleção de população predominantemente resistente, como consequência de tratamento irregular e/ou inadequado^{8,9,10}.

O tratamento da TB no Brasil adota dois esquemas: (a) Esquema E-I, para casos novos, sem tratamento anterior para TB e utiliza isoniazida (INH=H), rifampicina

(RMP=R), pirazinamida (PZA=Z) e (b) Esquema E-III, para casos de falência ao E-I e acrescenta etambutol (EMB=E), estreptomicina (SM=S) ou etionamida (ETH=Et)¹¹.

Para situações de TBMR, são indicados esquemas especiais com drogas de segunda linha (alternativas), sob os cuidados de um sistema de Vigilância Epidemiológica da TBMR, pois a transmissão de isolados de *M. tuberculosis* resistentes resistentes pode ter sérias repercussões na epidemiologia e controle da TB^{3,12}.

9.4 Critérios para realização do Teste de Sensibilidade

O objetivo do TS é determinar se os microrganismos presentes no paciente responderão ao tratamento com as drogas de primeira linha.

Existe controvérsia sobre a utilização do TS no manejo do tratamento individual de pacientes. Os países que possuem recursos financeiros recomendam a realização do TS para todos os pacientes no momento do diagnóstico. Já os países com poucos recursos não seguem esta prática e o TS fica então recomendado para casos especiais.

As indicações prioritárias para a realização do Teste de Sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas são:

- Retratamento após falência bacteriológica ao esquema E-I.
- Recidiva da doença.
- Reinício após abandono.
- Pacientes com suspeita de resistência primária.
- Contatos de um caso de tuberculose resistente.
- Vigilância epidemiológica.

Esses são os critérios divulgados no II Consenso Brasileiro de Tuberculose, em 2004¹¹, e do Guia de Vigilância Epidemiológica – Tuberculose¹³. Cada estado da Federação pode acrescentar detalhes ao seus Programas Estaduais de Controle da Tuberculose, visando intervir em determinadas situações por eles definidas como importantes. É o caso do Estado de São Paulo que, em 2002, publicou documento recomendando a realização de cultura e Teste de Sensibilidade para toda a população considerada de maior risco (moradores de rua, detentos, profissionais da saúde)¹⁴.

9.5 Métodos de Teste de Sensibilidade

A sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas pode ser avaliada pelo método das concentrações absolutas, método da razão de resistência e o método das proporções. Esses são considerados os métodos clássicos ou convencionais para Teste de Sensibilidade de *M. tuberculosis*.

Os métodos padronizados e validados para investigar a sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose de primeira linha quantificam a proporção de mutantes resistentes a cada uma das drogas contidos isolado bacteriano que afeta o paciente. Esses métodos são muito precisos, alcançando uma eficiência de 97% e 99%

para determinar a atividade da INH e RMP, respectivamente e em torno de 92% para EMB e SM. No entanto, para assegurar essa precisão é importante observar todas as etapas com muito cuidado e atenção, desde a aquisição das drogas, conservação, pesagem, preparação dos meios de cultura, padronização do inóculo, preparação das diluições, semeadura, observação do tempo de leitura do teste até o cálculo da proporção de colônias resistentes¹⁵.

A utilização desses métodos para avaliar a sensibilidade de outras micobactérias, que não sejam do “Complexo *M. tuberculosis*” (CMTB), não é recomendada, pois os resultados obtidos não apresentam uma boa correlação com a resposta terapêutica do paciente. Atualmente, para algumas espécies de micobactérias, a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da droga é o método recomendado¹⁶. Assim como para a cultura, existem os sistemas comerciais automatizados para realizar o Teste de Sensibilidade utilizando meios de cultura líquidos.

9.6 Método das proporções em meio LJ

Esse método foi descrito por Canetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste simplificado). A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes – “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente – “proporção crítica”^{17,18,19}.

No Quadro 1, estão as concentrações críticas para cada droga (concentração final no meio de cultura) e a proporção crítica, que dá o critério para definir se o isolado bacteriano é resistente ou sensível à droga.

Quadro 1 Critérios de resistência do *M. tuberculosis* às drogas no meio LJ com drogas

Drogas	Concentração Crítica (µg/ml)	Proporção Crítica (%)
Isoniazida (INH)	0,2	1
Rifampicina (RFP)	40	1
Etambutol (EMB)	2	1
Estreptomicina (SM)	4	1

Desse modo, considera-se que uma droga de primeira linha não tem atividade no tratamento da TB quando ela é testada frente a um isolado de *M. tuberculosis* que contém mais de 1% de bacilos resistentes a uma concentração crítica da determinada droga, previamente estabelecida²⁰.

O método das proporções pode ser realizado diretamente a partir de escarro positivo à baciloscopia (teste direto) ou a partir do isolado bacteriano (teste indireto).

O teste indireto é feito a partir do crescimento em meio de cultura e deve ser realizado em isolados bacterianos identificados como *M. tuberculosis*. É mais demorado do que o direto, com a vantagem de apresentar menor risco de contaminação.

O teste direto é aquele feito a partir da amostra clínica que já passou pelo processo de descontaminação. Deve-se diluir o material homogeneizado, antes de inocular nos meios de cultura, de acordo com o resultado da baciloscopia.

9.6.1 Meios de cultura sólidos LJ com drogas

A versão do método das proporções em meios de cultura sólidos à base de ovos (Löwenstein-Jensen – LJ) é a mais utilizada na maioria dos países da América Latina, incluindo o Brasil.

No método das proporções em meio LJ, as drogas são incorporadas antes da coagulação. As drogas utilizadas no TS são as do esquema de tratamento de primeira linha (INH, RMP, EMB e SM). Para facilitar a operacionalização da realização do TS no laboratório são incluídas outras duas drogas para identificação de micobactérias, que não são utilizadas no tratamento (ácido p-nitrobenzóico – PNB e Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico – TCH)²⁰.

O método das proporções também pode ser realizado em meios de cultura sólidos à base de agar (Middlebrook 7H10), recomendado pelo Center for Disease Control (CDC). Essa variante utiliza as drogas em concentrações diferentes daquelas utilizadas nos meios à base de ovos²¹.

Para o método das proporções, emprega-se o meio LJ sem droga e com droga. O meio sem droga permite conhecer o número total de bacilos semeados e o meio com droga, o número de mutantes resistentes à droga correspondente.

9.6.1.1 Preparação do meio LJ com drogas

Os cuidados com a qualidade das drogas e seu manuseio são fundamentais para assegurar resultados confiáveis dos Testes de Sensibilidade¹⁶.

Pesagem das drogas

Para a preparação da solução-mãe, o cálculo da quantidade a ser pesada de cada droga, tendo em conta a sua potência, é:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{concentração } (\mu\text{g/ml}) \times \text{volume (ml)}}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Potência} = \text{pureza} \times \text{fração ativa} \times (1 - \text{conteúdo de água})$$

Exemplo 1:

Sendo a potência da Dihidroestreptomicina sulfato = 800 mg de SM ativa por grama, calcular:

$$\frac{10.000 \times 10}{800} = 125 \text{ mg}$$

Pesar 125 mg da droga e dissolver em 10 ml de Água destilada estéril para obter uma solução-mãe na concentração de 10.000 µg/ml de SM.

Exemplo 2:

Sendo a potência da isoniazida = 1000 mg de INH ativa por grama, calcular:

$$\frac{10.000 \times 10}{1000} = 100 \text{ mg}$$

Pesar 100 mg da droga e dissolver em 10 ml de Água destilada estéril para obter uma solução-mãe na concentração de 10.000 µg/ml de INH.

Solução-Mãe (estoque)

A solução estoque da droga deve conter uma concentração tal que, por um lado, assegure uma completa dissolução e por outro lado seja suficientemente alta para não se inativar.

Considerando a potência de cada lote da droga e fazendo o ajuste quando necessário, é preciso preparar uma solução-mãe de 10.000 µg/ml em 10 ml de Água destilada estéril, etilenoglicol, propilenoglicol ou outro diluente. Essas soluções podem ser guardadas, aliquoteadas, em temperatura de -20°C ou menos. Essa prática pode ser adotada se houver garantia da estabilidade da rede de frio do laboratório.

Solução de uso

No dia de preparação do lote de meio com droga, a solução de uso de cada droga é preparada a partir da solução-mãe, tendo o cuidado de desprezar o restante da solução-mãe descongelada que não for utilizada no dia.

É importante garantir a precisão das diluições da solução-mãe utilizando pipetas graduadas e de volume compatível com o desejado. Ter o cuidado de sempre trocar de

pipeta depois de transferir o volume necessário para o tubo seguinte, antes de homogeneizar. Para incorporação no meio LJ, cada droga requer uma maneira diferente de preparo, com uma, duas ou sem diluições.

O Quadro 2 resume as concentrações de cada droga, a quantidade a ser incorporada ao meio de cultura e a concentração final.

Quadro 2 Preparação da droga para incorporar ao meio LJ

Solução mãe (10.000 µg/ml)	Diluyente	Diluições a realizar	Concentração da droga na última diluição (µg/ml)	Quantidade adicionada em 200 ml de meio LJ (ml)	Concentração final de droga no meio (mg/ml)
Isoniazida (INH)	Água destilada estéril	Duas 1:10	100	0,4	0,2
Rifampicina (RMP)	Etilenoglicol ou N,N-dimetilformamida	Nenhuma	10.000	0,8	40
Etambutol (EMB)	Água destilada estéril	Uma 1:10	1.000	0,4	2
Estreptomicina (SM)**	Água destilada estéril	Uma 1:10	1.000	0,8	4
TCH	Água destilada estéril	Uma 1:10	1.000	0,4	2
PNB	*	Nenhuma	10.000	5	500

* Para a preparação do PNB seguir as recomendações do anexo deste capítulo.

** Usar a Dihidroestrtomicina por ser uma droga mais estável e a técnica é padronizada para o uso desta formulação

Nos anexos deste capítulo estão descritas a preparação das soluções-mãe e soluções de uso de cada droga, a preparação dos meios com drogas e os formulários para o CQI destas preparações. O tempo de validade do meio LJ com drogas é, no máximo, de 2 meses sob refrigeração^{5,20}.

9.6.1.2 Método das proporções em LJ - teste indireto

Descrição

O método das proporções indireto é o mais utilizado nos laboratórios de saúde pública e consiste em se realizar o Teste de Sensibilidade a partir de um isolado puro de *M. tuberculosis*.

Precauções

Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3.

Realizar o teste preferencialmente a partir da cultura primária que deve estar na sua fase de crescimento logarítmica (média de 21 dias). Por outro lado, deve-se evitar realizar Teste de Sensibilidade em culturas com mais de 60 dias de semeados.

Nas culturas em que o número de colônias é menor que 20, não recomendamos a realização do Teste de Sensibilidade, pois essa amostra pode não ser representativa da população bacilar na lesão.

Observações

O preparo do meio LJ e do tubo nº 1 da Escala McFarland estão descritos nos anexos do Capítulo 7. O preparo da Solução de Álcool a 70% e Solução de Fenol a 5%, estão descritos no Capítulo 3.

Materiais

Equipamentos

- CSB
- Agitador mecânico.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pipetador automático ou manual.

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Solução de Álcool a 70%
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Gaze estéril em pedaços.
- Estante para os tubos de ensaio estéril 20 x 150 mm.
- Alça bacteriológica descartável e estéril.
- Tubos de ensaio 20 x 150 mm, de paredes reforçadas, com tampa de rosca, contendo 10 pérolas de vidro, estéreis.
- Tubos de ensaio 20 x 150 mm para as diluições.
- Pipetas estéreis de 1 e 10 ml.
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados. De preferência, uma bandeja para cada conjunto de tubos de uma mesma amostra.

- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.
- Para cada amostra: seis tubos de meios LJ sem droga e dois tubos de meios LJ com as drogas (INH, RMP, EMB, SM) e um tubo para o TCH e PNB.
- Cepas de referência para controle de qualidade do TS (cepa sensível e cepa resistente): sugerimos que estas cepas sejam preparadas junto com as amostras a serem testadas. O CQI do TS está descrito no item 9.9 deste capítulo.
- Tubo nº 1 da Escala McFarland.

Procedimentos de organização

Realizar os procedimentos de 1 a 3 fora da CSB

1. Identificar o número da cultura no tubo de ensaio com pérolas, para a suspensão bacteriana.
2. Identificar a diluição e o número da cultura nos tubos de ensaio para as diluições, de acordo com o seguinte:
 - para cada amostra, incluindo as cepas controle: tubos 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .
3. Identificar o número da cultura nos tubos de meios LJ sem e com droga para a semeadura do TS, de acordo com o seguinte (para cada amostra):
 - 1ª série, rotulados 10^{-3} : dois tubos de meio LJ sem droga (controle) os demais tubos de meio LJ contendo cada um a droga correspondente.
 - 2ª série, rotulados 10^{-5} : dois tubos de meio LJ sem droga (controle) os demais tubos de meio LJ contendo cada um a droga correspondente.
 - 3ª série, rotulados 10^{-6} : dois tubos de meio LJ sem droga (controle).

Observação: a diluição 10^{-6} nem sempre utilizada, facilita a leitura do TS quando o inóculo foi muito turvo (espesso) e a contagem das colônias ficou prejudicada nas outras diluições. Preparar a CSB conforme descrito no Capítulo 11.

Realizar os procedimentos de 4 a 5 dentro da CSB

4. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.
5. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.

Para acompanhar a realização do teste indireto do método das proporções em LJ, observar o item 9.12.2.1 - Figura 1, dos anexos deste Capítulo.

Procedimentos de realização: Etapa 1 – suspensão bacteriana (inóculo)

Realizar os procedimentos de 1 a 5 dentro da CSB

1. Transferir, com alça bacteriológica descartável estéril, o maior número possível de colônias de uma cultura em meio sólido para um tubo de ensaio com pérolas e 0,5 ml de Água destilada estéril.
2. Homogeneizar em agitador mecânico por 20 a 30 segundos.
3. Manter em repouso por 10 minutos.
4. Acrescentar aproximadamente 2 ml de Água destilada estéril.
5. Deixar em repouso por 10 minutos para sedimentar as partículas maiores.

Procedimentos de realização: Etapa 2 – diluições seriadas

Realizar os procedimentos de 6 a 11 dentro da CSB

6. Ajustar a turvação de cada suspensão com a turvação do tubo nº 1 da Escala McFarland utilizando Água destilada estéril, gota a gota.
7. A partir dessa suspensão padronizada, efetuar seis novas diluições em escala decimal.
8. Colocar 9 ml de Água destilada estéril em cada um dos tubos.
9. Transferir 1 ml da suspensão padrão para o tubo 10^{-1} , agitar no agitador mecânico.
10. Trocar a pipeta e seguir as diluições, transferindo 1 ml para o tubo 10^{-2} e assim sucessivamente até o tubo 10^{-6} . Para cada diluição utilizar novas pipetas estéreis.
11. As diluições 10^{-3} (1/1.000), 10^{-5} (1/100.000) e 10^{-6} (1/1.000.000) serão as diluições semeadas nos meios LJ com e sem droga.

Procedimentos de realização: Etapa 3 – semeadura nos meios de cultura

Realizar os procedimentos de 12 a 13 dentro da CSB

12. Inocular 0,1 ml das diluições 10^{-3} , 10^{-5} em cada tubo de meio de cultura com droga e sem droga, já identificados e 0,1 ml da diluição 10^{-6} em dois tubos de meio LJ sem droga. Trocar a pipeta para semear cada diluição.
13. Fechar os tubos de meio de cultura, sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Realizar os procedimentos de 14 a 15 fora da CSB

14. Retirar os tubos de meios de cultura semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio. Distribuir o inóculo em toda a superfície do meio para facilitar o crescimento de colônias separadas para a contagem.
15. Acondicionar os tubos de meios inoculados em bandeja de polipropileno, inclinados de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a

superfície do meio voltada para cima. Cuidar para que os tubos não rolem, pois isto propicia crescimento nas bordas do meio de cultura impossibilitando a contagem das colônias.

16. Incubar em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas e após, fechar as tampas completamente, somente se o inóculo tiver sido absorvido totalmente; se ainda permanecer úmido manter a tampa frouxa por mais 24 ou 48 horas.
17. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.

9.6.1.3 Método das proporções em LJ - teste direto

Descrição

O método das proporções direto é aquele realizado a partir do escarro positivo pela baciloscopia. Com o objetivo de abreviar o tempo do diagnóstico, principalmente nos casos de falência de tratamento, cujos escarros têm grande número de bacilos. Quando o resultado não for conclusivo, repete-se o teste³.

Precauções

Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3.

Observações

Os procedimentos de fluidificação-descontaminação do escarro seguem os descritos no Capítulo 7.

Materiais

Equipamentos

- CSB
- Agitador mecânico.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Pipetador automático ou manual.

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Solução de Álcool a 70%
- Solução de Fenol a 5%.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.

- Gaze estéril em pedaços.
- Estante para os tubos de ensaio estéril 20 x 150 mm.
- Alça bacteriológica descartável e estéril.
- Tubos de ensaio 20 x 150 mm para as diluições.
- Pipetas estéreis de 1 e 10 ml.
- Recipiente de vidro ou metal, fundo e de boca larga, para descarte de material a ser autoclavado e lavado.
- Bandeja de polipropileno com furos para a circulação do ar, para incubação dos tubos semeados. De preferência, uma bandeja para cada conjunto de tubos de uma mesma amostra.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.
- Para cada amostra: Controles: seis tubos de meios LJ sem droga. Testes: uma bateria de dois tubos de meios LJ para cada uma das drogas (INH, RMP, EMB, SM) e outra bateria de um tubo de meio LJ para as drogas TCH e PNB.

Preparação do inóculo para semear no teste direto

Antes de realizar o teste direto é preciso fazer a baciloscopia do escarro de acordo com o Capítulo 6. O quadro 3 mostra as diluições a serem semeadas nos meios LJ com e sem droga, conforme o número de cruzes da baciloscopia.

Quadro 3 Diluições semeadas de acordo com a baciloscopia

Resultado da Baciloscopia	Diluições semeadas em tubos LJ sem droga	Diluições semeadas em tubos LJ com droga
(+)	Não diluído, 10^{-2} e 10^{-3}	Não diluído e 10^{-2}
(++)	10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-4}	10^{-1} e 10^{-3}
(+++)	10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-5}	10^{-2} e 10^{-4}

Procedimentos de organização

Realizar a baciloscopia de cada escarro conforme descrito no capítulo 6 para conhecer o resultado. Realizar também a etapa da fluidificação-descontaminação conforme descrito no Capítulo 7 e utilizar o sedimento.

Realizar os procedimentos 1 e 2 fora da CSB

1. Identificar o número da cultura nos tubos de ensaio para as diluições, de acordo com o seguinte:
 - Escarro (+): 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .
 - Escarro (++): 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} .

- Escarro (+++): 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} .
2. Identificar o número da cultura nos tubos de meios LJ sem e com droga para a semeadura do TS, de acordo com o seguinte (para cada amostra):
 - Escarro (+): seis tubos controles (meios LJ sem droga): dois tubos para semear o sedimento não diluído e dois tubos para cada uma das diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Testes (meio LJ com drogas): uma bateria contendo um tubo de meio LJ para cada uma das drogas (INH, RMP, EMB, SM, TCH e PNB) para semear o sedimento não diluído e outra bateria (INH, RMP, EMB e SM) para semear a diluição 10^{-2} .
 - Escarro (++) : seis tubos controles (meio LJ sem droga): dois tubos para semear cada uma das diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-4} . Testes (meio LJ com drogas): uma bateria contendo um tubo de meios LJ para cada uma das drogas (INH, RMP, EMB, SM, TCH e PNB) para semear a diluição 10^{-1} e outra bateria (INH, RMP, EMB e SM) para semear a diluição 10^{-3} .
 - Escarro (+++) : seis tubos controles (meio LJ sem droga): dois tubos para semear cada uma das diluições 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-5} . Testes (meio LJ com drogas): uma bateria contendo um tubo de meio LJ para cada uma das drogas (INH, RMP, EMB, SM, TCH e PNB) para semear a diluição 10^{-2} e outra bateria (INH, RMP, EMB e SM) para semear a diluição 10^{-4} .

Realizar os procedimentos 3 e 4 dentro da CSB

3. Organizar os materiais que serão utilizados em um dos lados da bancada da CSB e colocar os recipientes de descarte conforme descrito no Capítulo 3.
4. Forrar a bandeja de metal com papel absorvente e colocá-la na bancada da CSB à sua frente.

Para acompanhar a realização do teste direto do método das proporções em LJ, observar o item 9.12.2.2 - Figura 2, dos anexos deste Capítulo

Procedimentos de realização

Para escarro (+)

Realizar os procedimentos de 5 a 10 dentro da CSB

5. Colocar 9 ml de Água destilada estéril nos tubos de ensaio já identificados para fazer as diluições de acordo com o item 1 (10^{-1} a 10^{-3}).
6. Transferir 1 ml do sedimento tratado não diluído para o tubo 10^{-1} e misturar bem. Trocar a pipeta e transferir 1 ml para o tubo 10^{-2} e assim sucessivamente até o tubo 10^{-3} . Para cada diluição utilizar novas pipetas estéreis.
7. Inocular 0,1 ml do sedimento tratado não diluído nos tubos LJ controle e nos tubos de meio LJ com drogas (INH, RMP, EMB, SM, TCH, PNB), correspondentes.

8. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-2} nos tubos LJ controle e nos tubos de meio LJ com drogas (INH, RMP, EMB, SM), correspondentes.
9. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-3} nos tubos LJ controle correspondentes.
10. Fechar os tubos de meio de cultura, sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Escarro (++)

Realizar os procedimentos de 5 a 10 dentro da CSB

5. Colocar 9 ml de Água destilada estéril nos tubos de ensaio já identificados para fazer as diluições, de acordo com o item 1 (10^{-1} a 10^{-4}).
6. Transferir 1 ml do sedimento tratado para o tubo 10^{-1} e misturar bem. Trocar a pipeta e transferir 1 ml para o tubo 10^{-2} e assim sucessivamente até o tubo 10^{-4} . Para cada diluição utilizar novas pipetas estéreis.
7. Inocular 0,1 ml do da diluição 10^{-1} nos tubos LJ controle e nos tubos de meio LJ com droga (INH, RMP, EMB, SM, TCH, PNB) correspondentes.
8. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-3} nos tubos LJ controle e nos tubos de meio LJ com droga (INH, RMP, EMB, SM), correspondentes.
9. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-4} nos tubos LJ controle correspondentes.
10. Fechar os tubos de meio de cultura, sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Procedimentos de realização

Escarro (+++)

Realizar os procedimentos de 5 a 10 dentro da CSB

5. Colocar 9 ml de Água destilada estéril nos tubos de ensaio já identificados para fazer as diluições, de acordo com o item 1 (10^{-1} a 10^{-5}).
6. Transferir 1 ml do sedimento tratado para o tubo 10^{-1} e misturar bem. Trocar a pipeta e transferir 1 ml para o tubo 10^{-2} e assim sucessivamente até o tubo 10^{-5} . Para cada diluição utilizar novas pipetas estéreis.
7. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-2} nos tubos LJ controle e nos tubos de meio LJ com droga (INH, RMP, EMB, SM, TCH, PNB), correspondentes.
8. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-4} nos tubos LJ controle e nos tubos de meio LJ com droga (INH, RMP, EMB, SM), correspondentes.
9. Inocular 0,1 ml da diluição 10^{-5} nos tubos LJ controle correspondentes.
10. Fechar os tubos de meio de cultura, sem rosquear a tampa até o fim e colocar esses tubos na estante.

Realizar os procedimentos de 11 a 14 fora da CSB

Os procedimentos de 11 a 14 são válidos para as três situações de escarro:

11. Retirar os tubos de meios de cultura semeados da estante e movimentar cada um deles de modo que o inóculo banhe a superfície do meio. Distribuir o inóculo em toda a superfície do meio para facilitar o crescimento de colônias separadas para a contagem.
12. Acondicionar os tubos de meios inoculados em bandeja de polipropileno, inclinados de maneira que o lado da tampa fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima. Cuidar para que os tubos não rolem, pois isso propicia crescimento nas bordas do meio de cultura impossibilitando a contagem das colônias.
13. Incubar em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas e, após, fechar as tampas completamente, somente se o inóculo tiver sido absorvido totalmente; se ainda permanecer úmido manter a tampa frouxa por mais 24 ou 48 horas.
14. Realizar a limpeza, descontaminação da bancada e o descarte do material contaminado, conforme descrito no Capítulo 3.

9.6.1.4 Incubação do TS em meio LJ

Após observar os tubos semeados e verificar secagem do inóculo e ausência de contaminação, em torno de 48 horas, fechar bem as tampas dos tubos e deixar incubando na estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

9.6.1.5 Leitura e interpretação do TS em meio LJ

Para poder interpretar o resultado do TS é necessário que aconteçam três condições simultaneamente:

- Crescimento suficiente (mais de 100 colônias) no tubo controle (LJ sem droga) semeado com a diluição mais concentrada (10^{-3}), para que seja possível detectar mutantes resistentes que estejam em menor porcentagem (cerca de 1%) entre os bacilos inoculados.
- Colônias separadas e contáveis no tubo controle (LJ sem droga) semeado com a diluição menos concentrada (10^{-5}). Essa condição é indispensável quando aparecem colônias resistentes cuja proporção deve ser determinada (cálculo da porcentagem).
- Boa correlação entre o número de colônias desenvolvidas em cada um dos meios semeados com as suspensões, de acordo com o fator de diluição aplicado, para que sejam válidas as quantificações que se aplicam com base na série de diluições.

Com 28 dias de incubação fazer a primeira leitura e observar se houve desenvolvimento de colônias suficiente para interpretar os resultados, sendo que a maioria

isolados bacterianos resistentes à INH e RMP (mais de 95%) pode ser detectada nesse período. Se houve casos de resistência com contagem de colônias suficiente para interpretar o resultado, este pode ser emitido nesse período. Se não houve resistência (todas as drogas estão sensíveis), aguarda-se a segunda leitura ao final de 42 dias. Essa precaução é para assegurar o aparecimento tardio de colônias mutantes resistentes¹⁵.

Procedimentos para leitura e interpretação do TS

Realizar a leitura dos tubos semeados em bancada bem iluminada, próxima à janela ou com foco de luz próximo (luminária). Se possível, utilizar lupa para melhorar a visualização das colônias pequenas.

Para acompanhar a leitura, observar o fluxograma de leitura e interpretação dos resultados do TS em LJ descritos no item 9.12.2.3 - Figura 3 dos anexos deste capítulo.

Para que os cálculos sejam válidos, as diluições devem ser realizadas com suspensões homogêneas e com muita precisão, trocando as pipetas toda vez que passar de uma suspensão concentrada para outra mais diluída e que o volume semeado em cada tubo seja exatamente o mesmo.

1. Quantificar o inóculo contando e fazendo a média das colônias desenvolvidas nos tubos de meio LJ controle (sem droga). Se o número de colônias na diluição 10^{-3} é incontável, contar o número de colônias da diluição 10^{-5} ou 10^{-6} , de maneira que seja possível contar colônias separadas. Fazer a média entre os tubos da mesma diluição. A partir dessa média podemos inferir o número de UFC (unidades formadoras de colônias) desenvolvidas nos controles semeados com diluições mais concentradas, multiplicando pelo fator de diluição correspondente.
2. Quantificar o número de UFC nos tubos contendo cada uma das drogas. Da mesma maneira, procurar o tubo onde as colônias estejam separadas e contáveis.
3. Calcular a porcentagem de UFC desenvolvidas na presença de cada droga com relação à média de UFC dos tubos controles. Se essa proporção é maior do que 1%, o isolado bacteriano é considerado **resistente** à droga em questão. Se a proporção é menor do que 1% o isolado bacteriano é considerado **sensível**.

Exemplo para a leitura do TS

Diluição	Número de UFC observadas					
	Tubos controle Meio sem droga		Tubos com droga			
			INH	RMP	SM	EMB
10 ⁻³	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis	1	0
10 ⁻⁵	6	3	2	3	0	0

1. **Tubos controle:** 10⁻³= incontáveis colônias e 10⁻⁵= média (6+3)/2 = 4,5 UFC. Podemos inferir que na diluição 10⁻³ tem 450 UFC.
2. **Tubo INH:** 10⁻³= incontáveis colônias e 10⁻⁵= 2 colônias. Fazendo a proporção (regra de três): se 4,5 UFC é 100% então 2 UFC é 44%. Sendo a proporção crítica para a INH=1%, o isolado bacteriano com 44% é **resistente**.
3. **Tubo RMP:** 10⁻³= incontáveis colônias e 10⁻⁵= 3 colônias. Fazendo a proporção (regra de três): se 4,5 UFC é 100% então 3 UFC é 67%. Sendo a proporção crítica para a RMP=1%, o isolado bacteriano com 67% é **resistente**.
4. **Tubo SM:** 10⁻³=1 colônia e 10⁻⁵ = nenhuma. A leitura é feita na diluição 10⁻³. Fazendo a proporção (regra de três): se 450 UFC é 100% então 1 UFC é 0,2%. Sendo a proporção crítica para a SM=1%, o isolado bacteriano é **sensível**.
5. **Tubo EMB:** 10⁻³ e 10⁻⁵= nenhuma colônia, o isolado bacteriano é sensível.

9.7 Sistemas comerciais automatizados de TS

9.7.1 Descrição

Os métodos baseados em meios de cultura líquidos constituem atualmente a opção mais utilizada, por apresentarem a vantagem do menor tempo de incubação, a padronização do inóculo e a leitura automatizada.

O sistema BACTEC 460TB (BD), um sistema semi-automatizado que utiliza meio líquido Middlebrook 7H9 modificado, foi o primeiro a ser utilizado nos países desenvolvidos, por apresentar resultados de resistência e/ou sensibilidade às drogas em 5 a 12 dias de incubação. Por ser um método radiométrico utilizando ¹⁴C na detecção do crescimento bacteriano, foi substituído por sistemas automatizados constituídos por um frasco contendo meio de cultura líquido com um sensor interno de detecção de crescimento bacteriano que pode ser colorimétrico, fluorimétrico ou de pressão, de acordo com o fabricante. Estes sistemas comerciais seguem o mesmo princípio do método das proporções, utilizando concentrações de drogas com atividade equivalente e proporções críticas de mutantes resistentes.

A seguir serão descritas as etapas para a realização do Teste de Sensibilidade no sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (BD)^{22,23}.

9.7.2 Procedimentos do TS em sistemas automatizados

Precauções

Realizar os procedimentos utilizando os cuidados de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados conforme descrito no Capítulo 3.

Observações: O preparo de criotubos com miçangas e meio líquido Sauton com 10% de glicerol para manutenção dos isolados bacterianos está descrito no Capítulo 10.

Materiais

Equipamentos

- CSB
- Sistema de incubação e detecção automática.
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.
- *Freezer* -20°C .
- Geladeira.
- Micropipeta automática capacidade 10 a 100 μl .
- Micropipeta automática capacidade 100 a 1000 μl .

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.
- Escala McFarland nº 1.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Bandejas quadriculadas de alumínio.
- Estantes de metal.
- Estantes de plástico compatíveis com o equipamento (AST Set Carrier).
- Estante de metal para transporte das estantes AST.
- Canetas para marcar vidro ponta fina e comum.
- Alça bacteriológica descartável estéril.
- Criotubos com 6 miçangas estéreis.
- Frasco de vidro com tampa de rosca, capacidade cerca de 3 ml, contendo 6 pérolas de 3 mm estéreis.
- Tubo 12 x 120 mm com tampa de silicone estéril.
- Frasco de vidro com tampa de rosca, capacidade para cerca de 10 ml.

- Frasco de vidro com tampa de rosca, capacidade para cerca de 30 ml.
- Pipeta Pasteur descartável estéril.
- Dispensador com seringa plástica de volume específico.
- Ponteiras com capacidade 10 a 100 µl.
- Ponteiras com capacidade 100 a 1000 µl.
- Gaze estéril em pedaços.
- Algodão.
- BD BBL™ MGIT™ Tubo de meio de cultura com indicador do crescimento de micobactérias (Tubo MGIT).
- Kit SIRE (S – estreptomicina (SM), I – isoniazida (INH), R – Rifampicina (RMP) e E – etambutol (EMB) BACTEC:
 - MGIT Estreptomicina (MGIT-S): 83 µg/ml.
 - MGIT Isoniazida (MGIT-I): 8.3 µg/ml.
 - MGIT Rifampicina (MGIT-R): 83 µg/ml.
 - MGIT Etambutol (MGIT-E): 415 µg/ml.
 - BACTEC MGIT SIRE Supplement (OADC960).
- Enriquecimento OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase).
- Tubo com meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) ou similar.
- Solução estoque de Ácido p-nitrobenzóico (PNB).
- Meio Sauton com 10% de glicerol.
- Lâmina para microscopia.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.

9.7.2.1 Preparação do inóculo

(a) A partir de crescimento em meio líquido (MGIT)

Para acompanhar a preparação do inóculo a partir de crescimento em meio líquido, observar o item 9.12.2.4 - Figura 4 dos anexos deste Capítulo.

1. Utilizar o tubo MGIT 7 ml positivo (tubo controle sem drogas) após 1 dia da positividade até no máximo 5 dias. Atenção: O dia que a positividade é detectada pelo equipamento é considerado **dia 0**.
2. Se o tubo passar de 5 dias, deverá ser repicado em outro tubo MGIT 7 ml e incubado no instrumento até a positividade.
3. Se o tubo estiver dentro de 2 dias de positividade (**dia 1** ou **dia 2**): diluir com micropipeta automática 0,1 ml do crescimento bacteriano em 10 ml de Água destilada estéril (suspensão 1:100) e inocular no tubo controle. Nos tubos com droga inocular diretamente do tubo com crescimento (dia 1 ou dia 2).

4. Se o tubo estiver com positividade (**dia 3, dia 4 ou dia 5**), diluir com micropipeta automática 1 ml do meio com crescimento do tubo positivo em 4 ml de Água destilada estéril, fazendo uma diluição 1:5 e inocular nos tubos com droga. Para os tubos controle: diluir com micropipeta automática 0,1 ml do crescimento bacteriano em 10 ml de Água destilada estéril (suspensão 1:100).

(b) A partir de crescimento em meio sólido

Para acompanhar a preparação do inóculo a partir de crescimento em meio sólido, observar o item 9.12.2.5 - Figura 5 dos anexos deste Capítulo.

Procedimentos de organização

Frasco 1 – para fazer a suspensão

- Utilizar um frasco com tampa de rosca, capacidade para cerca de 3 ml.
- Colocar aproximadamente 6 pérolas de vidro.
- Esterilizar em estufa a 180° C por 2 horas.
- Distribuir, assepticamente, 2 ml de Água destilada estéril com pipeta graduada, em cada um dos frasquinhos.

Frasco 2 – para fazer a diluição 1/5

- Utilizar um frasco com tampa de rosca, capacidade para cerca de 10 ml.
- Esterilizar os frascos a 180° C por 2 horas.
- Assepticamente, distribuir 4 ml de Água destilada estéril.

Frasco 3 – para fazer a diluição 1/100

- Utilizar um frasco com tampa de rosca, capacidade para cerca de 30 ml.
- Esterilizar os frascos a 180° C por 2 horas.
- Assepticamente, distribuir 10 ml de Água destilada estéril.
- Bandeja – preparar uma bandeja de alumínio com divisões colocando um frasco 1, um frasco 2 e um criotubo com miçangas. Numerar todos os tubos com o número de cada isolado a ser testado. Para os criotubos marcar o número do isolado bacteriano no corpo e tampa dos tubos, com etiqueta própria para congelamento; numerar o frasco 3 com os números de cada isolado bacteriano a ser testado – colocar os frascos 3 em bandeja separada.
- Preparar uma listagem com o número dos isolados a serem testados .

Procedimentos de realização

1. Colocar a estante com os isolados bacterianos, a bandeja de alumínio com divisões com um frasco 1, um frasco 2 e um criotubo com miçanga, e a bandeja com os frascos 3 dentro da CSB.
2. Com alça bacteriológica descartável estéril retirar uma boa porção da massa bacteriana que está sobre o meio (procurar não retirar o meio junto). Procurar tocar em todas as colônias para ter uma boa representatividade da amostra.
3. Abrir o frasco 1, colocar a alça sobre as pérolas, fazer uma suspensão homogênea de bactérias.
4. Pegar mais massa bacilar com alça e fazer o mesmo no criotubo com as miçangas.
5. Descartar a alça no saco autoclavável.
6. Repetir esse procedimento até que todas as suspensões dos isolados bacterianos e da cepa controle (*M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294) estejam prontas.
7. Deixar a suspensão em repouso por 15 minutos, para decantar as partículas maiores e para evitar dispersão de aerossóis.
8. Com uma pipeta Pasteur, retirar cerca de 1 ml do sobrenadante e gotejar pela parede do tubo, ajustando a turvação da suspensão com o Tubo nº 1 McFarland.
9. Com a mesma pipeta, retirar todo o meio líquido Sauton do criotubo.
10. Realizar os procedimentos 8 e 9 para todas os isolados bacterianos, utilizando uma pipeta para cada isolado.
11. Com micropipeta automática, diluir 1 ml da suspensão acima em 4 ml de Água destilada estéril (frasco 2) – **suspensão 1:5**.
12. Com micropipeta automática, diluir 0,1 ml da suspensão preparada no item 8, em 10 ml de Água destilada estéril (frasco 3) – **suspensão 1:100**.

Suspensão 1:5 = Inóculo para uso nos meios com drogas e no TSA (Tryptic Soy Agar)

Suspensão 1:100 = Inóculo para uso no meio controle

13. Guardar os isolados bacterianos originais na geladeira até liberação dos resultados dos testes.

9.7.2.2 Preparação dos meios MGIT

Para a preparação dos meios de cultura MGIT para TS utilizados no sistema automatizado, seguir as instruções do fabricante, consistindo em preparar um tubo de MGIT com PNB e 4 tubos com as drogas SIRE (S=SM, I=INH, R=RMP e E=EMB).

Preparação do Meio MGIT com PNB

1. Assepticamente, adicionar 0,8 ml de OADC em cada tubo MGIT (1 tubo para cada teste). Este OADC não deve ser retirado do kit SIRE, pois o kit é utilizado para o preparo dos meios com droga SM, INH, RMP e EMB.
2. Assepticamente, utilizando uma micropipeta automática, pipetar 168 µl da solução estoque PNB em cada tubo MGIT. Marcar os tubos com o símbolo na cor padronizada pelo laboratório. Exemplo: símbolo – dois traços em X na cor preta.

Preparação do Meio MGIT com drogas SIRE

1. Preparo das drogas SIRE
2. Para o preparo da solução estoque das drogas SIRE, adicionar 4 ml de Água destilada estéril em cada frasco com as drogas SIRE conforme orientações do fornecedor.

Preparo do meio com as drogas SIRE

1. Assepticamente, adicionar 0,8 ml de suplemento SIRE (OADC) em cada tubo MGIT (5 tubos para cada teste).
2. Assepticamente, utilizando uma micropipeta automática, pipetar 100 µl de cada droga (SIRE) em cada tubo marcado, (um tubo para cada droga).
3. Marcar os tubos com o símbolo na cor padronizada pelo laboratório. Exemplo: símbolo= um traço inclinado. Cores: vermelha = estreptomicina, preta = isoniazida, azul = rifampicina e verde = etambutol.
4. Um tubo sem droga será usado como controle de crescimento bacteriano (CC).

9.7.2.3 Inoculação da suspensão bacteriana nos tubos

Para acompanhar a inoculação da suspensão bacteriana, observar o item 9.12.2.6 - Figura 6 dos anexos deste Capítulo.

Procedimentos de organização

1. Colocar o tubo controle de crescimento e um tubo de cada droga numa estante seguindo a ordem SIRE, o tubo de PNB e o de TSA.
2. Identificar com o número do isolado bacteriano, o tubo controle de crescimento, o tubo PNB e tubo TSA.

Procedimentos de realização

1. Inocular o tubo controle de crescimento (CC): com micropipeta automática, inocular 0,5 ml da suspensão 1:100 no tubo MGIT CC.

2. Inocular os tubos contendo drogas: com micropipeta automática inocular 0,5 ml da suspensão 1: 5 em cada um dos tubos contendo drogas estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R), etambutol (E) e ácido p-nitrobenzóico (PNB).
3. Rosquear e homogeneizar bem cada um dos tubos, para não prejudicar a leitura.
4. Inocular um tubo com TSA ou similar: com micropipeta automática inocular 0,5 ml da suspensão.
5. Após a inoculação de todos os testes, realizar a limpeza, descontaminação da CSB e da bancada e o descarte do material contaminado, conforme descrito no Capítulo 3.

9.7.2.4 Incubação no sistema automatizado

1. Dispor 5 tubos (CC e SIRE) na estante AST Set Carrier, na seguinte seqüência: (CC, S, I, R, E).
2. Incubar sistema de incubação BACTEC MGIT 960.
3. Antes de incubar cada estante, verificar o número do isolado bacteriano e localizá-lo na listagem de cepas. Na coluna posição anotar letra e números da gaveta na qual a estante será incubada.
4. Após a incubação de todas as estantes repetir, o procedimento para os tubos MGIT PNB.
5. Antes de incubar cada tubo, verificar o número do isolado bacteriano e anotar a letra e o número da gaveta que o tubo será incubado.
6. Após o término aguardar cerca de dois minutos para verificar se ocorreu algum erro no momento da incubação.
7. No caso de erro, irão acender os botões (+) e (-) da gaveta onde estiver o problema. Consultar o manual de instruções do instrumento BACTEC MGIT 960.
8. Incubar o tubo com TSA ou similar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Verificar após 48 horas. Se houver contaminação com outros microrganismos, anotar o resultado de contaminação.

9.7.2.5 Leitura e registro dos resultados no sistema automatizado

1. Verificar diariamente a indicação de resultados finalizados no equipamento BACTEC MGIT 960 que fornecerá os resultados de resistência ou sensibilidade das drogas a cada isolado bacteriano testado.
2. Imprimir os resultados dos testes finalizados.
3. Registrar o resultado para o Formulário de Leitura do TS Automatizado – MGIT (item 9.12.1.10 nos anexos deste Capítulo). e para o registro de cultura e Teste de Sensibilidade e para o livro de registro, e liberar o resultado utilizando os laudos padronizados de cada laboratório.

4. Antes da liberação dos resultados os laudos devem ser conferidos por duas pessoas quanto ao número da cultura, o nome e o resultado.
5. Anotar os testes que apresentarem erro e tomar as providências devidas, descritas em “intercorrências”.

Intercorrências:

1. Erro 10 – erro imediatamente após a colocação na gaveta; posicionamento da estante de forma incorreta, correção imediata.
2. Erro 400 – crescimento rápido; pode ser excesso de inóculo, MNT de crescimento rápido ou contaminação:
 - Fazer uma lâmina dos tubos PNB e TSA. Caso seja contaminação descartar o teste e soltar o resultado como contaminado.
 - PNB positivo e TSA negativo e lâmina do tubo controle BAAR = provável MNT – encaminhar para identificação.
 - PNB negativo e TSA negativo e lâmina do tubo controle BAAR = CMTB – repetir o teste.
3. Erro 200 – ocorre após 12 dias, quando não há crescimento no tubo controle (cepa NC). Pegar o isolado bacteriano original e repicar em meios LJ, LJ + PS, OK, 7H9; incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para tentar recuperar. Após o crescimento repetir o teste.
4. Discordância entre os resultados do Teste de Sensibilidade de isolado bacteriano isolado e/ou recebido anteriormente e do atual. Repetir novamente o TS dos dois isolados e no caso de manter a discordância soltar o resultado com uma carta explicativa.

Resultados do PNB

1. Acompanhar o tubo PNB de acordo com o protocolo de leitura dos meios com droga, ou seja, resultado positivo ou erro. O teste com PNB finaliza e será interpretado como negativo, 3 dias após a finalização de todos os Testes de Sensibilidade.
2. Anotar os resultados do PNB no livro de registro. Os testes PNB (+) serão concluídos após preparação de lâmina e confirmação da presença de BAAR ou outras bactérias.
 - PNB negativo = isolado bacteriano identificado como provável *M. tuberculosis*.
 - PNB positivo: lâmina com presença de BAAR = provável MNT. Utilizar o isolado bacteriano original e encaminhar para realizar a identificação da micobactéria.

- PNB positivo: lâmina não BAAR = PNB contaminado. Verificar o resultado do TSA:
 - a. Se o resultado do TSA for “contaminado” anotar no livro de registro resultado CO (contaminado) e liberar esse resultado finalizando o teste.
 - b. Se o TSA estiver negativo, sugere que a contaminação foi localizada no tubo do PNB; fazer lâmina do tubo controle e dos tubos com drogas que estiverem (+). Se na lâmina, o resultado for presença de BAAR sem contaminação, o teste pode seguir até a finalização.

9.8 Teste de Sensibilidade para drogas alternativas

9.8.1 Descrição

A capacidade das MNT em produzir doença está documentada na literatura e sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de micobactérias^{24,25,26}.

O diagnóstico de doença causada por MNT exige muita cautela, pois o isolamento dessas espécies a partir de materiais clínicos não estéreis pode significar colonização transitória ou contaminação. Por isso, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença e para determinação da estratégia terapêutica^{25,27}.

São poucos os estudos sobre correlação do resultado dos Testes de Sensibilidade convencionais, descritos anteriormente neste capítulo, e o prognóstico clínico para as doenças causadas por MNT. Por esse motivo, não é recomendável a realização do TS convencional para todas as espécies. Em alguns casos, com confirmação de que a cepa isolada é clinicamente significativa para o paciente, pode-se realizar o TS, desde que haja cautela na interpretação do resultado²⁷.

De acordo com as recomendações do NCCLS/CLSI e ATS/IDSA, o método mais aceito é o que determina a Concentração Mínima Inibitória (CMI), que é definida como a menor concentração da droga capaz de impedir o crescimento microbiano e está validado para ser realizado em algumas espécies de MNT^{16,25}.

9.8.2 Utilidades do método

Atualmente vários estudos são realizados utilizando essa metodologia de determinação da CMI de *M. tuberculosis* e de MNT frente às drogas de tratamento^{28,29,30} na busca de alternativas para avaliar:

- Drogas alternativas para o tratamento de TBMR.
- Drogas alternativas para o tratamento de MNT.
- Novas drogas ou produtos ativos para desenvolvimento de novas drogas para determinar sua potencialidade.

9.8.3 Micobactérias e drogas testadas

As drogas para determinação da CMI serão utilizadas de acordo com a micobactéria isolada:

Quadro 4 Espécies de MNT e as drogas utilizadas para CMI

Espécies de MNT	Drogas utilizadas	
Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	Amikacina (AK)	Imipenem (IMI)
	Claritromicina (CLAR)	Cefoxitina (CEF)
	Ciprofloxacina (CIP)	Doxiciclina (DX)
	Sulfamethoxazole (SUL)	Linezolid (LIN)
	Tobramicina (TO)	
Observação: Imipenem não deve ser testado para <i>M. chelonae</i> e <i>M. abscessus</i>		
Complexo <i>M. avium</i> <i>M. avium</i> e <i>M. intracellulare</i>	Claritromicina (CLAR)	
	Azitromicina (AZ)	
<i>M. kansasii</i>	Estreptomicina (SM)	Rifabutina (RB)
	Isoniazida (INH)	Ciprofloxacina (CIP)
	Etambutol (EMB)	Amikacina (AK)
	Rifampicina (RMP)	Claritromicina (CLAR)
Para estudos de ação de drogas ou caracterização de outras espécies	Estreptomicina (SM)	Amikacina (AK)
	Isoniazida (INH)	Clofazemina (CLOF)
	Etambutol (EMB)	Claritromicina (CLAR)
	Rifampicina (RMP)	Etionamida (ETH)
	Rifabutina (RB)	D-cicloserina (CS)
	Ciprofloxacina (CIP)	Doxiciclina

9.8.4 Preparação das drogas

Solução-mãe das drogas

Preparar uma solução-mãe de cada droga a 10.000 µg/ml de cada droga: pesar 0,1 g da droga e dissolver em 10 ml de Água destilada estéril ou outro diluente, de acordo com o Quadro 5.

Quadro 5 Preparação da solução-mãe das drogas e os diluentes correspondentes

Diluentes	Drogas
H ₂ O	CS, DX, SM, INH, EMB, CIP e AZ
DMSO (Dimetil sulfóxido)	CLA, ETH, CLOF e RB
Metanol	RMP

CS = cicloserina, DX = doxiciclina, SM = estreptomicina, AK = amicacina, RB = rifabutina, ETH = etionamida, CLA = claritromicina, INH = isoniazida, CIP = ciprofloxacina, EMB = etambutol, RMP = rifampicina, CLOF = clofazemina, AZ = azitromicina

A solução-mãe pode ser aliquotada em criotubos e conservada a -70°C, por até 12 meses, com estabilidade satisfatória¹⁶. Quando conservada a -20°C, a validade é de 6 meses.

A clofazemina não deve ser armazenada, pois não mantém a estabilidade e a etionamida tem prazo de validade de 30 dias a -20°C.

Solução de uso das drogas

A solução de uso das drogas é preparada a partir da solução-mãe, em meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC.

No dia da preparação da solução de uso, descongelar a solução-mãe e descartar o volume restante.

Para as drogas: CS, DX, SM, AK, CLA, ETH, INH, EMB, CIP, CLOF e RB, realizar uma diluição 1:10 a partir da solução-mãe, ficando assim numa concentração de 1.000 µg/ml. A partir desta concentração, seguir as informações do Quadro 6 para obter a concentração final que será levada aos orifícios da linha A da microplaca. Para a droga AZ, não precisa fazer a diluição 1:10 e podemos partir da solução-mãe, diretamente. Para calcular a concentração final que cada droga deverá ter nos orifícios da linha A da microplaca, utilizar os dados do Quadro 6:

Quadro 6 Preparação da solução de uso para obtenção das concentrações finais de cada droga, nos orifícios da linha A da microplaca, para um volume de 1 ml.

Drogas	Concentração final nos orifícios da linha A da microplaca (µg/ml)	Solução de uso = Solução-mãe diluída 1:10 (1.000 µg/ml)* µl + meio 7H9 µl
CS	128	512 + 488
DX	64	256 + 744
SM	32	128 + 872
AK	32	128 + 872
CLA	32	128 + 872
ETH	32	128 + 872
INH	16	64 + 936
EMB	16	64 + 936
CIP	16	64 + 936
RMP	8	32 + 968
CLOF	8	32 + 968
RB	4	16 + 984
AZ*	512	250 + 970

* Para a droga AZ utilizar a solução-mãe sem diluir

CS = cicloserina, DX = doxiciclina, SM = estreptomicina, AK = ampicilina, RB = rifabutina, ETH = etionamida, CLA = claritromicina, INH = isoniazida, CIP = ciprofloxacina, EMB = etambutol, RMP = rifampicina, CLOF = clofazemina, AZ = azitromicina

A concentração da solução de uso deverá ser quatro vezes maior do que a concentração final, primeira concentração da diluição seriada e corresponde a linha A da microplaca. Para exemplificar: o primeiro orifício contém 100 µl de meio, ao colocar 100 µl de droga a concentração cai pela metade, e ao inocular 100 µl da suspensão bacteriana a concentração novamente cai pela metade.

Observar os itens 9.12.1.11, 9.12.1.12 e 9.12.1.13 dos anexos deste Capítulo que mostra os esquemas das microplacas da CMI para Micobactérias de Crescimento Rápido, Complexo *M. avium* e *M. kansasii*, respectivamente.

9.8.5 Procedimentos da CMI

Precauções

Ao trabalhar com meios líquidos é necessário intensificar os cuidados com a produção de aerossóis. Realizar os procedimentos utilizando as recomendações de biossegurança como as boas práticas de laboratório e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, conforme descrito no Capítulo 3.

Considerando que o método utiliza volumes muito pequenos é importante que as micropipetas automáticas estejam calibradas para evitar erros significativos.

Cuidado especial no preparo das drogas e diluições para obter a concentração correta.

Observações: A preparação do meio de cultura Middlebrook 7H9/OADC e formulário para controle da preparação estão descritas no anexo deste capítulo. A preparação da Solução de Álcool a 70% e da Solução de Fenol a 5% está descrito no Capítulo 3. A preparação do tubo nº 1 da Escala McFarland está descrito no Capítulo 7.

Materiais

Equipamentos

- CSB
- Estufa bacteriológica a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Freezer -20°C .
- Geladeira.
- Micropipeta automática capacidade de 1 a 50 μl .
- Micropipeta automática capacidade de 50 a 200 μl , com variação de volume de 1 μl .
- Micropipeta automática capacidade de 100 a 1000 μl , com variação de volume de 1 μl .
- Micropipeta multicanal com 12 canais capacidade de 100 a 200 μl .
- Micropipeta multicanal com 8 canais capacidade de 100 a 200 μl .
- Distribuidor de meio (repete) com seringa de 100, 10 e 30 μl .
- Suporte com espelho para leitura das placas.

Reagentes

- Água destilada estéril.
- Drogas de escolha (de acordo com a micobactéria).
- Metanol.
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Resazurina e MTT.
- Solução de Álcool a 70%.
- Solução de Fenol a 5%.
- Tubo nº 1 McFarland.

Insumos

- Papel absorvente (papel de filtro ou papel-toalha) para forrar a bancada.
- Canetas para marcar vidro ponta fina e comum.
- Alça bacteriológica descartável estéril.
- Tubo de ensaio 13 x 100 mm, com tampa de rosca, estéril (2 para cada cepa testada, para preparar o inóculo).

- Microplacas com 96 orifícios, fundo em U, com tampas, estéreis.
- Pipeta Pasteur descartável estéril.
- Ponteiras para micropipetas de 1, 200 e 1000 µl.
- Meio líquido Middlebrook 7H9 ou Caldo Muller-Hinton cátion suplementado.
- Enriquecimento Middlebrook OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase).
- Reservatório canaleta estéril, para distribuição de meio com micropipeta multicanal.
- Criotubo de 1,5 ml.
- Gaze estéril em pedaços.
- Saco plástico tipo zippack ou filme plástico.
- Caixa plástica com tampa e trava para acondicionar microplacas na estufa.
- Recipiente plástico de boca larga para o material ser autoclavado e descartado.
- Saco plástico autoclavável para acondicionamento dos recipientes de descarte.
- Balão volumétrico capacidade de 200 ml e de 10 ml.
- Frasco erlenmeyer capacidade de 200 ml.
- Frascos de vidro com tampa de rosca capacidade de 10 a 30 ml, um para cada droga utilizada.
- Formulário com esquema da microplaca e as drogas que estão sendo testadas e leitura dos resultados (itens 9.12.2.11, 9.12.2.12 e 9.12.2.13).
- Cepas de referência para controle de sensibilidade e resistência.

Procedimentos de organização

Realizar os procedimentos de 1 a 3 fora da CSB

1. Como é uma técnica que exige muita atenção, organizar todo o material necessário para sua execução e dedicar-se exclusivamente a essa atividade.
2. Trazer para próximo à CSB, em local visível, o Formulário com esquema da microplaca a ser utilizada para seguir o esquema atentamente.
3. Identificar na microplaca o número do isolado bacteriano a ser testado.

Os formulários com os esquemas das microplacas e as diferentes drogas assim como o espaço para anotações da leitura das CMI obtidas, encontram-se no anexo deste capítulo:

- Item 9.12.1.11 Formulário de Determinação da CMI de Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR).
- Item 9.12.1.12 Formulário de Determinação da CMI do Complexo *M. avium*.
- Item 9.12.1.13 Formulário de Determinação da CMI de *M. kansasii*.

Procedimentos de realização – preparação das microplacas

Utilizar microplacas novas, descartáveis, estéreis, de 96 orifícios, com fundo em U, com tampa para baixa evaporação, própria para cultura de células.

Realizar os procedimentos de 1 a 4 dentro da CSB

1. Distribuir 100 µl de meio 7H9-OADC em todos os orifícios da microplaca utilizando micropipeta multicanal de 12 canais.
2. Colocar 100 µl da solução de uso de cada droga na linha **A** da microplaca, com exceção da fileira **H**. Executar esse procedimento com muito cuidado, trocando as ponteiros para cada droga. Seguir um dos esquemas dos itens 9.12.1.11, 9.12.1.12 ou 9.12.1.13
3. Realizar as diluições seriadas: colocar a micropipeta multicanal na linha **A**, homogeneizar, retirar 100 µl e passar para a linha **B**, homogeneizar e passar para a linha **C** e assim sucessivamente até a linha **G**, desprezando 100 µl desta linha. Em cada linha é preciso homogeneizar (2 vezes) antes de transferir para a linha seguinte. Na linha **H** não vai droga, fica apenas com o meio de cultura e será o controle de crescimento da cepa (CCC).
4. As microplacas prontas, com as drogas diluídas, podem ser conservadas à -20°C e têm validade de um mês.

Procedimentos de realização – suspensão bacteriana (inóculo)

A cepa de micobactéria deve estar identificada como espécie.

Realizar os procedimentos de 1 a 6 dentro da CSB

1. A partir da cepa em meio sólido LJ, que deve estar na fase logarítmica de crescimento, fazer um subcultivo: retirar com alça bacteriológica descartável estéril uma boa quantidade do crescimento bacteriano, de forma a ser representativo da amostra e transferir para um tubo contendo 3 ml de meio 7H9/OADC.
2. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante um período de 3 dias para as micobactérias de crescimento rápido e de 7 dias para as de crescimento lento.
3. Após o período de incubação, homogeneizar, deixar sedimentar durante 5 minutos e utilizar o sobrenadante.
4. Suspensão padrão: em tubo de ensaio contendo meio 7H9/OADC, gotejar o sobrenadante até ajustar a turvação com a do tubo nº 1 da Escala McFarland.
5. Suspensão de uso: num volume final de 10 ml, fazer uma diluição 1:25 da suspensão padrão em meio 7H9/OADC. Para isso, colocar 9,6 ml de meio 7H9/OADC num tubo de ensaio e adicionar 0,4 ml da suspensão padrão e misturar suavemente.

Procedimentos de realização – inoculação nas microplacas

Realizar o procedimento 6 dentro da CSB

6. Com micropipeta multicanal (4 canais) transferir 100 µl da suspensão de uso para todos os orifícios da microplaca. Na linha **H** também coloca-se o inóculo, com exceção de um dos orifícios que será o controle do meio (CM).

Realizar o procedimento 7 e 8 fora da CSB

7. Colocar as microplacas dentro de sacos plásticos, fechar bem e colocá-las dentro de uma caixa de plástico fechada e com trava e levar para a estufa. Esses cuidados evitam a evaporação pelo calor da estufa e protege de acidentes graves como o derrame de líquido e produção de aerossol.
8. Realizar a limpeza, descontaminação da CSB e da bancada e o descarte do material contaminado conforme descrito no Capítulo 3.

Incubação das microplacas

Incubar em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 a 5 dias para MCR de 7 a 10 dias para as de MNT de crescimento lento.

Revelação e leitura nas microplacas

Após o período de incubação de acordo com a micobactéria testada, fazer a leitura das microplacas.

Antes de retirar as microplacas da estufa, preparar a solução reveladora, que poderá ser Resazurina ou MTT.

Solução reveladora

Trata-se de indicadores colorimétricos de crescimento celular, baseados na oxirredução de um indicador colorido adicionado ao meio de cultura depois que a micobactéria ficou exposta às drogas antituberculose. A resistência é detectada pela mudança de cor do indicador, a qual é diretamente proporcional ao número de micobactérias viáveis presentes no meio de cultura.

Os indicadores, resazurina e MTT -3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazolium bromide, têm sido utilizados como reveladores nos testes de determinação da CMI em microplacas, para micobactérias frente às drogas de primeira e segunda linha, com resultados comparáveis e em concordância com o método das proporções^{31,32}.

Preparação da solução reveladora

Realizar os procedimentos dentro da cabine de exaustão

- **Resazurina:** Preparar uma solução 0,01 % de resazurina em Água destilada: pesar 0,002 g em 20 ml de Água destilada.
- **MTT:** Preparar uma solução de 5 mg/ml de MTT em Água destilada: pesar 50 mg em 10 ml de Água destilada.
- Ambas as soluções podem ser conservadas a 4°C por uma semana, protegida da luz.

Leitura do teste

Realizar os procedimentos dentro da CSB

A leitura é feita dentro da CSB, com o auxílio de um suporte com espelho, onde a microplaca é colocada de modo que seja possível observar o crescimento no fundo dos orifícios sem erguer ou movimentar.

- Proceder primeiro uma leitura visual, sem o uso do indicador, comparando o crescimento nos orifícios (CCC) e o orifício (CM).
- O crescimento vai aparecer como um botão ou turvação no fundo da microplaca.
- Registrar os resultados obtidos no formulário específico de resultados, de acordo com a micobactéria testada.
- Proceder a revelação com o indicador escolhido.

Revelação do teste

Realizar esses procedimentos dentro da CSB

Manter próximo à CSB, em local visível, o formulário com esquema da microplaca que está sendo utilizada.

Ao retirar o saco ou o filme plástico, evitar movimentos bruscos e cuidar para que a água de condensação que poderá estar na tampa da microplaca não caia sobre os orifícios do teste.

Com Resazurina: adicionar 30 µl da solução de resazurina nos orifícios de controle: **H1**, controle de crescimento (CCC) e controle do meio (CM):

- Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.
- Após esse período, verificar se houve mudança de cor, de azul para rosa, no orifício **H1**, indicando que houve crescimento bacteriano. O outro controle (CM) deverá permanecer azul, indicando ausência de crescimento bacteriano. Caso o **H1** não apresente mudança de cor, incubar por mais 3 dias e repetir o procedimento.

- Se houve mudança de cor em **H1**, adicionar 30 µl da solução de resazurina em todos os orifícios onde foi inoculado a bactéria e no 2º orifícios controle (CCC). Incubar por mais 24 horas.

Com MTT: adicionar 10 µl da solução de MTT nos orifícios de controle: **H1**, controle de crescimento (CCC) e controle do meio (CM) e seguir o mesmos passos descritos para a resazurina. A mudança de cor que indica crescimento bacteriano é de amarelo para roxo.

Interpretação do teste

- Após esse período verificar se houve mudança de cor nos orifícios do teste e se a cor apresentada é comparável à cor do 2º orifício controle (CCC).
- Se a condição acima foi atendida, o teste pode ser interpretado e determinada a CMI para cada droga.
- CMI = é a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento de 90% da cepa testada. Ou seja, a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa, quando usamos a resazurina como revelador e de amarelo para roxo quando usamos o MTT.
- Registrar os resultados obtidos no formulário específico de resultados, de acordo com a micobactéria testada.
- Descartar todo o material utilizado seguindo as recomendações da biossegurança no Capítulo 3.

ATENÇÃO: De acordo como CLSI/NCCLS16, os resultados da CMI são expressos como: sensível, sensibilidade moderada e resistente. Estas categorias foram definidas após estudos com número significativo de microrganismos, para cada classe de droga. As CMI foram analisadas em relação à farmacocinética da droga em dosagens normais utilizadas e, sempre que possível, os critérios interpretativos dos testes “in vitro” foram analisados em relação a estudos de eficácia clínica no tratamento do microrganismo específico.

9.9 Controle de qualidade interno

As recomendações gerais quanto à limpeza da vidraria, assim como a qualidade e conservação dos meios de cultura, já referenciadas em outros capítulos, são descritos com detalhes no Capítulo 7.

Verificar se os Testes de Sensibilidade estão sendo realizados de amostras de pacientes que tenham algum fator de risco de resistência à drogas antituberculose, se-

guindo os critérios estabelecidos pelo PNCT. De outra forma, os resultados produzidos pelo laboratório não terão utilidade.

9.9.1 CQI das drogas utilizadas

Os cuidados com a qualidade, conservação, atividade e precisão na pesagem das drogas são fundamentais para assegurar resultados confiáveis dos Testes de Sensibilidade¹⁶. Por esse motivo, é conveniente que o LR se responsabilize pela compra centralizada, pesagem e distribuição dessas drogas. Esse laboratório também será responsável por prover a rede de laboratórios com as instruções de preparação das diluições e incorporação destas aos meios de cultura¹⁵.

Fonte da droga

Para a aquisição comercial das drogas deve-se ter em conta a sua qualidade e confiabilidade. O fabricante deve fornecer impresso no rótulo o nome genérico da droga, sua potência, data de validade, condições de conservação.

Potência da droga

Potência da droga é o número de microgramas da droga ativa por miligrama de peso total do produto. Nem toda a droga é apresentada em sua forma pura pelo fabricante e uma porção do seu peso pode ser devido a impurezas ou devido a algum radical que compõe a molécula. A potência de cada lote de fabricação da droga deve vir impressa no rótulo do produto ou no seu certificado de qualidade, e deve ser ajustada, se for o caso, cada vez que for adquirida.

Conservação e manuseio da droga

Observar estritamente as recomendações do fabricante (no rótulo ou no certificado de qualidade) quanto às condições de conservação, pois algumas necessitam serem mantidas em *freezer* enquanto que outras sob refrigeração. Manter sempre a droga no frasco original e dentro de um dessecador para evitar a absorção de umidade.

Quando descongelar as alíquotas da solução-mãe da droga, para preparar a solução de uso, após utilizar o volume necessário, descartar o volume que sobrou. Nunca congelar novamente a droga depois de haver descongelado.

Pesagem da droga

As drogas devem ser pesadas em balanças analíticas calibradas e com certificado de calibração válido.

9.9.2 CQI dos meios LJ com drogas

Para os meios de cultura com drogas se aplicam os mesmos controles detalhados no Capítulo 7: aspectos macroscópicos: cor, consistência textura e volume, controle de esterilidade e microbiológico. É importante observar que, se os meios de cultura com drogas não são bem conservados, as drogas incorporadas podem perder sua atividade.

No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.

Controle microbiológico

Para controlar a qualidade dos meios de cultura LJ com drogas, com relação ao desempenho em demonstrar a resistência às drogas da micobactérias, cada lote produzido deve ser semeado com uma cepa de referência sensível a todas as drogas testadas e outra cepa resistente¹⁵.

As cepas de referência recomendadas para demonstrar sensibilidade são *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, ambas são sensíveis a todas as drogas testadas, sendo a cepa H37Ra considerada avirulenta¹⁶.

Para monitorar possíveis erros nos meios produzidos com drogas (por exemplo, excesso de droga), o que leva a resultados sensíveis, é importante o uso das cepas resistentes. Por outro lado, sabemos que o uso de cepa resistente na rotina do laboratório aumenta o risco biológico, não sendo recomendado o uso de uma cepa resistente a todas as drogas¹⁵. Sugerimos que seja utilizada uma combinação de cepas, cada uma resistente a uma das drogas testadas, principalmente INH e RMP.

Os procedimentos para realizar este controle microbiológico segue o descrito no Capítulo 7. Para facilitar, sugerimos que o controle de cada lote do TS, seja preparado junto, no mesmo lote, com as amostras a serem testadas.

Os registros dos resultados devem ser preenchidos de maneira clara e organizados em formulários descritos no anexo deste capítulo. Se for detectado resultados não esperados, recomenda-se anular os resultados de todo o lote e repeti-las com novo lote de meios.

9.9.3 CQI do processamento do TS

- Organização de todo o material necessário, antes de iniciar. A área de trabalho na CSB não deve ter acúmulo de materiais, já que a técnica requer o uso de uma quantidade muito grande de materiais, ao mesmo tempo.
- Cultura primária: sempre que possível dar preferência para realizar o Teste de Sensibilidade a partir do crescimento primário, desde que contenha 20 ou mais colônias. Para preparar o inóculo raspar o maior número de colônias possível.

Nas culturas em que o número de colônias é menor que 20, não recomendamos a realização do Teste de Sensibilidade, pois essa amostra pode não ser representativa da população bacilar na lesão. Nesse caso, realizar um subcultivo do isolado bacteriano para aumentar o número de colônias, não significa melhorar as suas características e, portanto, não é recomendado.

- Verificar se a cultura está pura, se as colônias têm a mesma morfologia e caso isso não ocorra, não realizar o Teste de Sensibilidade antes de tratar e descontaminar a cultura.
- No caso de existir água de condensação nos tubos de meio de cultura, desprezar a mesma sobre gaze ou papel de filtro, estéreis, para facilitar a absorção do inóculo semeado.
- Qualidade do inóculo: a preparação das diluições é fundamental para assegurar que todos os tubos recebam o mesmo inóculo e que os cálculos da proporção de mutantes resistentes tenha significado. Para isso é importante ter um bom padrão de turvação (Escala McFarland), recém preparada, sem precipitações. A suspensão deve ser homogênea, deixando-a decantar durante alguns minutos para que os grumos se depositem e quando retirar a alíquota não tocar no fundo do tubo. É preciso assegurar a precisão da medida do volume inoculado, que deve ser sempre o mesmo em todos os tubos semeados e garantir a troca de pipetas durante as diluições seriadas.
- Verificar a completa absorção do inóculo antes do fechamento das tampas. Nesse momento, havendo presença de contaminação, descartar o teste e repeti-lo.

9.9.4 CQI da leitura e resultados do TS

No momento da primeira leitura (28 dias) de incubação, verificar se o inóculo está adequado:

- Morfologia das colônias são características de *M. tuberculosis*.
- Colônias contáveis nos tubos controles semeados com a diluição 10^{-5} .
- Presença de pelo menos 100 colônias nos tubos controles semeados com a diluição 10^{-3} .
- Quantidade de colônias com a diluição 10^{-5} de aproximadamente 100 vezes menor do que a obtida com a diluição 10^{-3} .

Se estas condições não são atendidas, repete-se o teste imediatamente. Se estiverem adequadas e se detectam resistência a alguma droga, numa proporção acima de 1% em relação ao controle, deve-se informar imediatamente a resistência detectada para agilizar a orientação de tratamento adequado. Se não aparece resistência, aguarda-se até completar 42 dias de incubação. O resultado definitivo é emitido após a leitura do TS com 42 dias de incubação.

Conciliar os resultados do teste de um paciente com resultados anteriores obtidos para o mesmo paciente. No caso de observar incoerências ou discordâncias entre os resultados, repetir o teste partindo, de preferência, do isolamento primário.

9.9.5 CQI do sistema automatizado – MGIT

- Para se descartar uma possível contaminação bacteriana ou fúngica deve-se semear cada suspensão bacteriana a ser testada em um tubo de meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA). Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e realizar a leitura após 48 horas de incubação.
- Utilizar uma cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv a cada lote novo de drogas a serem testadas. Essa cepa controle é sensível a todas as drogas de primeira linha na concentração utilizada na técnica.

9.9.6 CQI DA CMI

Somente realizar a CMI de cepas de micobactérias com a espécie identificada e que seja cultura pura.

Seguir as mesmas recomendações descritas acima no que se refere aos cuidados de preparação das drogas, pesagem, qualidade e conservação.

Utilizar uma cepa de referência da mesma espécie que está sendo testada com a CMI e proceder às mesmas recomendações, inoculando uma microplaca cada vez que utilizar um lote novo de meios e de drogas.

De acordo com a CLSI/NCCLS¹⁶, as cepas de referência utilizadas para a determinação da CMI são: *M. avium* (ATCC 700898) para o controle do Complexo *M. avium*; *M. kansasii* (ATCC12478) para o *M. kansasii* e *M. peregrinum* (ATCC 700686) para o controle das Micobactérias de Crescimento Rápido.

9.10 Controle de qualidade externo

Desde 1994, a OMS criou uma Rede de Laboratórios Supranacionais (RLSN) que normaliza e coordena a supervisão externa indireta do Teste de Sensibilidade no mundo³³. Atualmente, o laboratório coordenador da RLSN é o Instituto de Medicina Tropical da Bélgica. Essa rede está conformada por 20 laboratórios supranacionais e cresce à medida que se detecta a necessidade de estabelecer um novo laboratório em alguma região.

Todo laboratório que realiza Teste de Sensibilidade às drogas antituberculose deve ser avaliado por LR seja nacional ou regional, e estes devem ser avaliados por um laboratório supranacional.

Em cada país o laboratório de referência nacional deve coordenar um programa de controle de qualidade para os laboratórios da sua rede que realizam Teste de Sensibilidade.

No Brasil, como foi descrito no Capítulo 7 para o Controle de Qualidade Externo (CEQ) da Cultura, o laboratório de referência nacional deve executar esse programa em conjunto com os laboratórios de referência regionais.

O CQE consiste no envio de um painel de cepas com fenótipo de resistência selecionado para poder avaliar, em cada laboratório, a precisão dos resultados do Teste de Sensibilidade frente às quatro drogas de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina. O número de cepas que compõe o painel é duplicado e recebe um código sorteado ao acaso, que, assim como os resultados dos testes, somente o laboratório que está coordenando o programa conhece.

O laboratório coordenador realiza os Testes de Sensibilidade de cada cepa do painel e os replica, em número suficiente, para enviar aos laboratórios da rede que serão supervisionados. Os painéis devem ser transportados com as medidas de biossegurança requeridas para esse tipo de material de risco biológico.

Os laboratórios supervisionados realizam os Testes de Sensibilidade às cegas, utilizando o método recomendado e aplicado na rotina de trabalho.

Os resultados informados de cada laboratório são comparados com o “resultado consenso” (acordado pela maioria dos laboratórios supranacionais) e cada resultado é classificado em: (a) verdadeiro resistente; (b) falso resistente; (c) falso sensível; (d) verdadeiro sensível.

Para cada droga, é calculada a sensibilidade, especificidade, eficiência e reprodutibilidade. A sensibilidade avalia o acerto na detecção da resistência; a especificidade, o acerto na determinação da ausência de resistência; e a eficiência, o acerto no total de resultados. A reprodutibilidade avalia a consistência dos resultados produzidos pelo laboratório.

As experiências dos LSN mostram que o monitoramento dessas sucessivas avaliações pode incrementar a qualidade dos laboratórios. Como meta de desempenho para os laboratórios, espera-se uma eficiência de 92% para SM e EMB, de 97% para INH e de 99% para RMP. Os limites de aceitabilidade de eficiência estabelecidos classificam como não aceitáveis, as eficiências menores que 80% para EMB e SM, que 89% para INH e que 95% para RMP^{33,34}.

Após análise dos resultados, cada laboratório participante deve ser informado dessa avaliação.

No caso de serem observados resultados imprecisos, em especial à INH e RMP, deverá ser identificada a causa da imprecisão, assim como sugestões para reverter essa situação. Como consequência pode ser oferecido treinamento, se for o caso e é enviado novo painel ao laboratório, desenhado especialmente de acordo com o problema detectado. Até que se verifique que o laboratório recuperou a qualidade do seu trabalho, os Testes de Sensibilidade da rotina do laboratório deverão ser realizado pelo laboratório de referência nacional.

É importante manter todos os registros de monitoramento da precisão alcançada pelos laboratórios em sucessivos controles.

9.11 Referências

1. WHO/World Health Organization. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994–1997*. WHO/TB/97.229. Geneva, Switzerland, 1997.
2. ESPINAL, M.A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSCHENG, Z.; KIM, S.J.; TLALI, E.; SMITH, I. SUAREZ P.; ANTUNES, M.L.; GEORGE, A.G.; MARTIN-CASABONA, N.; SIMELANE, P.; WEBER, K.; BINKIN, N. and RAVIGLIONE, M.C. *Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries*. Int J Tuberc Lung Dis, 5(10):887-893, 2001.
3. ALAT/Asociación Latinoamericana del Tórax. Consenso del Departamento de Tuberculosis. *Guías Latinoamericanas de Diagnostico y Tratamiento de La Tuberculosis Fármacorresistente*. Versión final octubre 2007.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. *Protocolo do II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em Tuberculose no Brasil*, 2005.
5. BRAGA, J.U.; BARRETO, A.M.W.; HIJJAR, M.A. *Inquérito Epidemiológico da Resistência às Drogas usadas no Tratamento da Tuberculose no Brasil, 1995 – 1997*, IERDTB. Parte III: principais resultados. Bol Pneumol Sanit, 11(1):76-81, 2003.
6. WHO/World Health Organization. *Anti-tuberculosis Drug Resistance in the world*. Report nº 2. Prevalence and Trends. WHO/CDS/TB/2000.278. Geneva. Switzerland, 2000.
7. WHO/World Health Organization. *Anti-Tuberculosis drug resistance in the world*. Report nº 3. WHO/CDS/TB/2004. Geneva. Switzerland, 2004.
8. TAKIFF, H.E. The molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In I. Bastian & F. Portaels (ed). *Multidrug-resistant tuberculosis*. Klawer Academic Publishers, 2000.
9. GILLESPIE S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. Antimicrob Agents Chemother, 46(2):267-274, 2002.
10. DAVID H.; BRUM, L.; PRIETO, E. *Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa, 1994.
11. SBPT/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. J Bras Pneumol, 30 (Supl.1): S57-S86, 2004.
12. DALCOLMO, M.P.; FORTES, A.; FIUZA DE MELO, F.A.; MOTTA, R.; IDE NETTO, J.; CARDOSO, N.; ANDRADE, M.; BARRETO, A.W.; GERHARDT, G. *Estudo de efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil*. J Bras Pneumol, 25:70-7, 1999.

13. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Tuberculose. Guia de Vigilância Epidemiológica*. 1ª Edição. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde (Ascom), Brasília, 100p. 2002.
14. SES-SP/Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. CVE/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Tuberculose. *Manual de orientação para coleta de amostras de escarro e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose*. São Paulo, 26p. 2002.
15. Instituto Nacional de Enfermidades Infecciosas. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. *Prueba de Sensibilidad*. Lucía Barrera. Documento não impresso.
16. CLSI/ Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS/ The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard. Document M24-A, 23(18):84p. Pennsylvania, USA, 2003.
17. CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDURROY, P.; LANGEROVA, M.; MAHLER, H.T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D.A.; and SULA, L. *Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance*. Bulletin of the World Health Organization, 29:565-578, 1963.
18. CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 92(5):687-703, 1965.
19. CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST, N.; SMELEV, N.A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bulletion of the Word Health Organization*, 4:21-43. 1969.
20. BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Procedimentos de Bacteriologia da Tuberculose do II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em Tuberculose no Brasil*, Brasília, 2005.
21. KENT, P.T. and KUBICA, G.P. Public Health Mycobacteriology. *A guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control, Atlanta, USA. 1985.
22. SIDDIQI, S.H.; RÜSCH-GERDES, S. MGIT™ Procedure Manual for Bactec™ MGIT™ TB System. *Mycobacteria Growth Indicator Tube Culture and Drug Susceptibility Demonstration Project*. Prepared for The Foundation for Innovation New Diagnostics (FIND), 2006.
23. BD/Beckton Dickinson. Bactec Mgit 960 Sire Kits – For The Antimycobacterial Susceptibility Testing Of Mycobacterium Tuberculosis. Revised: 2002.
24. FALKINHAM J.O. *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria*. *Clin Microbiol Rev*, 9:1777-215, 1996.
25. ATS/The American Thoracic Society. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 175:367-416, 2007.

26. TORTOLI, E. *Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s*. Clin Microbial Rev, 16:319-54, 2003.
27. SES-SP/Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. CVE/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. IAL/Instituto Adolfo Lutz. *Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento*. Disponível em (<http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/>). Acesso em 14 mar 2006.
28. TELLES, M.A.S.; YATES, M.D. Single and double drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by a micro-dilution broth medium minimum inhibitory concentration (MIC) method. Tubercle and Lung Disease. 75:286-290, 1994.
29. PALOMINO, J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. Eur Respir J. 26(2):339-50. Review, 2005.
30. MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple and inexpensive method. Antimicrob Agents Chemother, 47(11): 3616-3619, 2003.
31. MARTIN, A.; MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; TELLES, M.A.S.; SIMBOLI, N.; PONTINO, M.; PORRAS, T.; LEON, C.; VELASCO, M.; CHACON, L.; BARRERA, L.; RITACCO, V.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. Int J Tuberc Lung Dis. 9(8):901-6, 2005.
32. MORCILLO, N.; DI GIUGLIO, B.; TESTAN, B.; PONTINO, M.; CHIRICO, C.; DOLMANN, A. A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. Int J Tuberc Lung Dis, 8(2): 253-259, 2004.
33. LAZLO, A.; RAHMAN, M.; ESPINAL, M.; RAVIGLIONE, M.; WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis. Sep;6(9):748-56, 2002.
34. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Emilio Coni”. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Garantía de Calidad de los Métodos Bacteriológicos aplicados al Diagnóstico y Control de Tratamiento de Tuberculosis. Grupo de redacción: María Delfina Sequeiro, Omar Latini, Beatriz López, Norberto Simboli, Lucía Barrera. Documento não impresso (versão final revisada), 2006.

9.12 Anexos do capítulo

9.12.1 Preparação dos Meios para TS e CMI

9.12.1.1 Preparação do Meio LJ com INH

Preparação do meio LJ com isoniazida 0,2 mg/ml	
(a) Preparação da Solução-mãe de isoniazida 10.000 mg/ml	
Isoniazida (Isonicotinic acid hydrazide = Isonicotinic hydrazide) – Sigma-Aldrich	100 mg
Água destilada estéril	10 ml
1) Pesar a isoniazida em frasco estéril. Considerar a potência e realizar o cálculo do ajuste da pesagem, se necessário; 2) Dissolver em Água destilada estéril. 3) Aliquotar a solução-mãe em criotubos com 1 ml e conservar a – 20°C por no máximo 4 meses.	
(b) Preparação da Solução de uso de isoniazida	
Obs.: No dia da preparação do meio com droga, descongelar um criotubo da solução-mãe da droga.	
4) A partir da solução-mãe (10.000 mg/ml) realizar uma diluição 1:10, adicionando 1 ml em 9 ml de Água destilada estéril. 5) A partir desta solução (1.000 mg/ml) realizar outra diluição 1:10, adicionando 1 ml em 9 ml de Água destilada estéril (100 mg/ml).	
(c) Preparação do meio LJ com isoniazida 0,2 mg/ml	
6) Adicionar 0,4 ml desta solução (100 mg/ml) a 200 ml de meio LJ completo (preparado como no Capítulo 7). 7) Manter o meio homogêneo, sob agitação, durante sua distribuição nos tubos.	
Obs.: No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.	
8) Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. A distribuição deve ser cuidadosa com agitação regular. 9) Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C. 10) Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C. 11) Desta maneira se obtém o meio de cultura com isoniazida na concentração final de 0,2 mg/ml.	

9.12.1.2 Preparação do Meio LJ com RMP

Preparação do meio LJ com rifampicina 40,0 mg/ml	
(a) Preparação da Solução-mãe de rifampicina 10.000 mg/ml	
Rifampicina (3-[4-Methylpiperazinyliminomethyl]rifamycin SV= Rifamycin AMP = Rifampin) – Sigma-Aldrich	100 mg
Metanol, Etilenoglicol ou N,N-dimetilformamida	10 ml
1) Pesar a rifampicina em frasco estéril. Considerar a potência e realizar o cálculo do ajuste da pesagem, se necessário. 2) Dissolver em metanol, Etilenoglicol ou N,N-dimetilformamida. 3) Aliquotar a solução-mãe em criotubos com 1 ml e conservar a – 20°C por no máximo 4 meses.	
(b) Preparação do meio LJ com rifampicina 40,0 mg/ml	
Obs.: No dia da preparação do meio com droga, descongelar um criotubo da solução-mãe da droga. Obs.: a rifampicina não tem solução de uso.	
4) Adicionar 0,8 ml da solução-mãe (10.00 mg/ml) a 200 ml de meio LJ completo (preparado como no Capítulo 7). 5) Manter o meio homogêneo, sob agitação, durante sua distribuição nos tubos.	
Obs.: No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.	
6) Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. A distribuição deve ser cuidadosa com agitação regular. 7) Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C. 8) Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C. 9) Desta maneira se obtém o meio de cultura com rifampicina na concentração final de 40,0 mg/ml.	

9.12.1.3 Preparação do Meio LJ com EMB

Preparação do meio LJ com etambutol a 2 mg/ml	
(a) Preparação da Solução-mãe de etambutol 10.000 mg/ml	
Etambutol (2,2'-[1,2-Ethanediyldiimino]bis-1-butanol dihydrochloride = Ethambutol dihydrochloride) – Sigma-Aldrich	100 mg
Água destilada estéril	10 ml
1) Pesar o etambutol em frasco estéril. Considerar a potência e realizar o cálculo do ajuste da pesagem, se necessário; 2) Dissolver em Água destilada estéril; 3) Aliquotar a solução-mãe em criotubos com 1 ml e conservar a – 20°C por no máximo 4 meses;	
(b) Preparação da Solução de uso de etambutol	
Obs.: No dia da preparação do meio com droga, descongelar um criotubo da solução-mãe da droga;	
4) A partir da solução-mãe (10.000 mg/ml) realizar uma diluição 1:10, adicionando 1 ml em 9 ml de Água destilada estéril;	
(c) Preparação do meio LJ com etambutol 2 mg/ml	
5) Adicionar 0,4 ml desta solução (100 mg/ml) a 200 ml de meio LJ completo (preparado como no Capítulo 7); 6) Manter o meio homogêneo, sob agitação, durante sua distribuição nos tubos.	
Obs.: No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.	
7) Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. A distribuição deve ser cuidadosa com agitação regular; 8) Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C; 9) Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C; 10) Desta maneira se obtém o meio de cultura com etambutol na concentração final de 2 mg/ml;	

9.12.1.4 Preparação do Meio LJ com SM

Preparação do meio LJ com estreptomicina 4 mg/ml	
(a) Preparação da Solução-mãe de estreptomicina 10.000 mg/ml	
Estreptomicina (Dihydrostreptomycin sesquisulfate) – Sigma-Aldrich	100 mg
Água destilada estéril	10 ml
1) Pesar a estreptomicina em frasco estéril. Considerar a potência e realizar o cálculo do ajuste da pesagem, se necessário. 2) Dissolver em Água destilada estéril. 3) Aliquotar a solução-mãe em criotubos com 1 ml e conservar a – 20°C por no máximo 4 meses.	
(b) Preparação da Solução de uso de estreptomicina	
Obs.: No dia da preparação do meio com droga, descongelar um criotubo da solução-mãe da droga.	
4) A partir da solução-mãe (10.000 mg/ml) realizar uma diluição 1:10, adicionando 1 ml em 9 ml de Água destilada estéril.	
(c) Preparação do meio LJ com estreptomicina 4 mg/ml	
5) Adicionar 0,8 ml desta solução (100 mg/ml) a 200 ml de meio LJ completo (preparado como no Capítulo 7). 6) Manter o meio homogêneo, sob agitação, durante sua distribuição nos tubos.	
Obs.: No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.	
7) Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. A distribuição deve ser cuidadosa com agitação regular. 8) Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C. 9) Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C. 10) Desta maneira se obtém o meio de cultura com estreptomicina na concentração final de 4 mg/ml.	

9.12.1.5 Preparação do Meio LJ com TCH

Preparação do meio LJ com TCH 2 mg/ml	
(a) Preparação da Solução-mãe de TCH 10.000 mg/ml	
Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2-Thiophenecarboxylic acid hydrazide) – Sigma-Aldrich	100 mg
Água destilada estéril	10 ml
1) Pesar a TCH em frasco estéril. Considerar a potência e realizar o cálculo do ajuste da pesagem, se necessário. 2) Dissolver em Água destilada estéril. 3) Aliquotar a solução-mãe em criotubos com 1 ml e conservar a – 20°C por no máximo 4 meses.	
(b) Preparação da Solução de uso de TCH	
Obs.: No dia da preparação do meio com droga, descongelar um criotubo da solução-mãe da droga.	
4) A partir da solução-mãe (10.000 mg/ml) realizar uma diluição 1:10, adicionando 1 ml em 9 ml de Água destilada estéril.	
(c) Preparação do meio LJ com TCH 2 mg/ml	
5) Adicionar 0,4 ml desta solução (100 mg/ml) a 200 ml de meio LJ completo (preparado como no Capítulo 7). 6) Manter o meio homogêneo, sob agitação, durante sua distribuição nos tubos.	
Obs.: No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.	
7) Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. A distribuição deve ser cuidadosa com agitação regular. 8) Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C. 9) Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C. 10) Desta maneira se obtém o meio de cultura com TCH na concentração final de 2 mg/ml.	

9.12.1.6 Preparação do Meio LJ com PNB

Preparação do meio LJ com PNB 500 mg/ml	
(a) Preparação da Solução-mãe de PNB 10.000 mg/ml	
Ácido p-nitrobenzólico (PNB) – 4-Nitrobenzoic acid – Aldrich	200 mg
Propilenoglicol ou Solução de NaOH 1N	10 ml
1) A solução de PNB pode ser preparada utilizando propilenoglicol ao solução de NaOH 1N, conforme descrito no item Anexos do Capítulo 7.	
(b) Preparação do meio LJ com PNB 500 mg/ml	
2) Adicionar 5,0 ml desta solução (100 mg/ml) a 200 ml de meio LJ completo (preparado como no Capítulo 7).	
Obs.: o PNB não tem solução de uso.	
3) Manter o meio homogêneo, sob agitação, durante sua distribuição nos tubos.	
Obs.: No momento de adicionar o meio à droga é importante manter sob agitação constante para que a droga seja realmente incorporada em todo o volume de meio e ao mesmo tempo suave para não produzir bolhas de ar e prejudicar a distribuição do meio nos tubos.	
4) Distribuir um volume de 10 ml em tubos de ensaio estéril de 20 x 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. A distribuição deve ser cuidadosa com agitação regular.	
5) Coagular imediatamente, para prevenir sedimentação. Colocar os tubos inclinados na bandeja do coagulador, que deve estar aquecido e regulado na temperatura de 85°C.	
6) Coagular por 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio e o tempo de coagulação começa a contar a partir do momento que atingiu 85°C.	
7) Desta maneira se obtém o meio de cultura com PNB na concentração final de 500 mg/ml.	

9.12.1.7 Preparação do Meio Líquido Middlebrook 7H9 com OADC

Preparação do Meio Líquido 7H9 para CMI	
(a) Preparação do Meio líquido 7H9 Base	
Base Middlebrook 7H9	4,7 g
Água destilada	900 ml
Glicerol	2 ml
1) Dissolver a base de Middlebrook 7H9 em Água destilada. 2) Acrescentar o Glicerol. 3) Autoclavar a 121 °C por 10 minutos. Manter em geladeira. 4) Validade: 3 meses (antes de usar visualizar ausência de contaminação).	
(b) Preparação do Meio líquido 7H9 com OADC	
Meio Líquido 7H9 Base	180 ml
Middlebrook enriquecimento OADC	20 ml
5) No momento do uso para o preparo das microplacas , medir 180 ml e adicionar 20 ml de enriquecimento OADC (ácido oleico – albumina – dextrose – catalase). 6) Validade do 7H9 com enriquecimento: 1 mês (antes de usar verificar se não há contaminação).	

9.12.1.8 Formulário de Produção de Meios LJ com Drogas para Teste de Sensibilidade



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Produção de Meios LJ com Drogas para Teste de Sensibilidade

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Meio LJ com INH, RMP, EMB, SM, TCH e PNB		Nº Lote Produzido
Substância	Fórmula	Procedência	Nº Lote Fabricante	Validade	Pesagem/Volume
Fosfato Monopotássico					
Sulfato de Magnésio					
Citrato de Magnésio					
Glutamato de Sódio					
Asparagina					
Glicerol					
Verde Malaquita					
Ovos					
ou Meio Base LJ Comercial					
Água destilada					
Esterilização Autoclave - Solução Meio Base					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle	Responsável
				☐ Aprovado ☐ Reprovado	
Observações:					
Incorporação das drogas e distribuição nos tubos identificados por droga Controlado em formulário separado para cada droga					
Coagulação - Meio Completo + Droga					
Equipamento	Temperatura	Tempo	Data	Controle	Responsável
				☐ Aprovado ☐ Reprovado	
Observações:					
Aspectos Macroscópicos					
Cor	Consistência	Volume	Inclinação	Textura	Responsável
☐ A ☐ R	☐ A ☐ R	☐ A ☐ R	☐ A ☐ R	☐ A ☐ R	
Observações:				Data:	
A = Aprovado = conforme esperado			R = Reprovado = em desacordo com o esperado		
Controle de Esterilidade - Incubação a 36 ± 1°C até 48 horas					
Data:			Estufa:		
☐ Aprovado = Não Houve Crescimento de Microrganismos			☐ Reprovado = Houve Crescimento de Microrganismos		
Observações:				Responsável:	

9.12.1.9 Formulário - Leitura do TS pelo Método das Proporções em LJ



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

9.12.1.9 Formulário - Leitura do TS pelo
Método das Proporções em LJ

Nº do Lote:		Data da semeadura:		Responsável :						Responsável pela Leitura:						Supervisão:					
Nº Amostra	Nome Paciente	Diluição	LJ controle	INH		EMB		RMP		SM		PNB		TCH		Observações					
				28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias								
Nº Amostra	Nome Paciente	Diluição	LJ controle	INH		EMB		RMP		SM		PNB		TCH		Observações					
				28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias								
Nº Amostra	Nome Paciente	Diluição	LJ controle	INH		EMB		RMP		SM		PNB		TCH		Observações					
				28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias								

Formulário - Leitura do TS pelo Método Automatizado MGIT

[illegible]

9.12.1.11 Formulário - Determinação da CMI de Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR)



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Determinação da CMI de Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR)

Esquema da Microplaca com as Drogas e as Concentrações correspondentes para a CMI de Micobactérias de Crescimento Rápido												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	128	32	16	16	64	32	64	128	32			
B	64	16	8	8	32	16	32	64	16			
C	32	8	4	4	16	8	16	32	8			
D	16	4	2	2	8	4	8	16	4			
E	8	2	1	1	4	2	4	8	2			
F	4	1	0.5	0.5	2	1	2	4	1			
G	2	0.5	0.25	0.25	1	0.5	1	2	0.5			
H	CCC	CCC	CCC	CCC	CM	CM						
	AK	CLA	CIP	DX	CEF	IMI	LIN	SUL	TO			

CCC = Controle de Crescimento da Cepa CM = Controle de Esterilidade do Meio
CEF = cefoxitin, IMI = imipenem, LIN = linezolid, SUL = sulfamethoxazole, TO = tobramicina

Sensível ☐ Sensibilidade Moderada ☐ Resistente ☐

Esquema da Microplaca para os resultados das CMI obtidos												
Identificação da Micobactéria:							Nº da cepa:					
Data do teste:					Data da leitura:			Revelador:				
Responsável:						Observações:						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	CCC	CCC	CCC	CCC	CM	CM						
	AK	CLA	CIP	DX	CEF	IMI	LIN	SUL	TO			

CCC = Controle de Crescimento da Cepa CM = Controle de Esterilidade do Meio
CEF = cefoxitin, IMI = imipenem, LIN = linezolid, SUL = sulfamethoxazole, TO = tobramicina

9.12.1.12 Formulário - Determinação da CMI do Complexo *M. avium*

Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Determinação da CMI
do Complexo *M. avium*

Esquema da Microplaca com as Drogas e as Concentrações correspondentes para a CMI do Complexo <i>M. avium</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	132	512										
B	64	256										
C	32	128										
D	16	64										
E	8	32										
F	4	16										
G	2	8										
H	CCC	CCC	CCC	CM								
	CLA	AZ										

CCC = Controle de Crescimento da Cepa CM = Controle de Esterilidade do Meio
CLA = claritromicina, AZ = azitromicina

Sensível ☐ Sensibilidade Moderada ☐ Resistente ☐

Esquema da Microplaca para os resultados das CMI obtidos												
Identificação da Micobactéria:							Nº da cepa:					
Data do teste:				Data da leitura:				Revelador:				
Responsável:						Observações:						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	CCC	CCC	CCC	CM								
	CLA	AZ										

CCC = Controle de Crescimento da Cepa CM = Controle de Esterilidade do Meio
CLA = claritromicina, AZ = azitromicina

9.12.1.13 Formulário - Determinação da CMI do *M. kansasii*



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário - Determinação da CMI do *M. kansasii*

Esquema da Microplaca com as Drogas e as Concentrações correspondentes para a CMI do <i>M. kansasii</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32	16	16	8	4	16	32	32				
B	16	8	8	4	2	8	16	16				
C	8	4	4	2	1	4	8	8				
D	4	2	2	1	0,5	2	4	4				
E	2	1	1	0,5	0,25	1	2	2				
F	1	0,5	0,5	0,25	0,12	0,5	1	1				
G	0,5	0,25	0,25	0,12	0,06	0,25	0,5	0,5				
H	CCC	CCC	CCC	CCC	CM	CM						
	SM	INH	EMB	RMP	RB	CIP	AK	CLA				

CCC = Controle de Crescimento da Cepa CM = Controle de Esterilidade do Meio
SM = estreptomicina, INH = isoniazida, EMB = etambutol, RMP = rifampicina,
RB = rifabutina, CIP = ciprofloxacina, AK = amikacina CLA = claritromicina

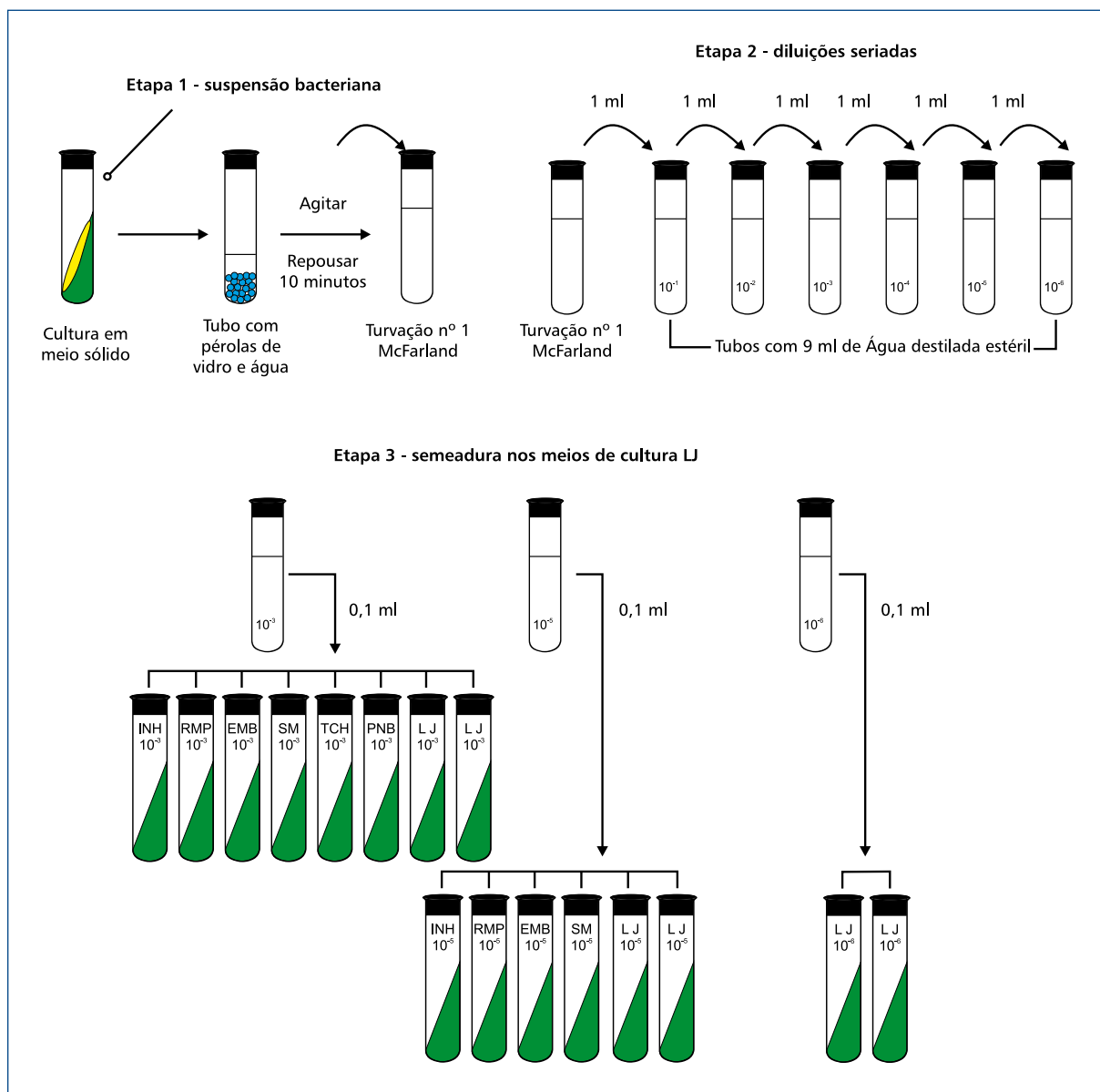
Sensível ☐ Sensibilidade Moderada ☐ Resistente ☐

Esquema da Microplaca para os resultados das CMI obtidos												
Identificação da Micobactéria:							Nº da cepa:					
Data do teste:				Data da leitura:				Revelador:				
Responsável:						Observações:						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	CCC	CCC	CCC	CCC	CM	CM						
	SM	INH	EMB	RMP	RB	CIP	AK	CLA				

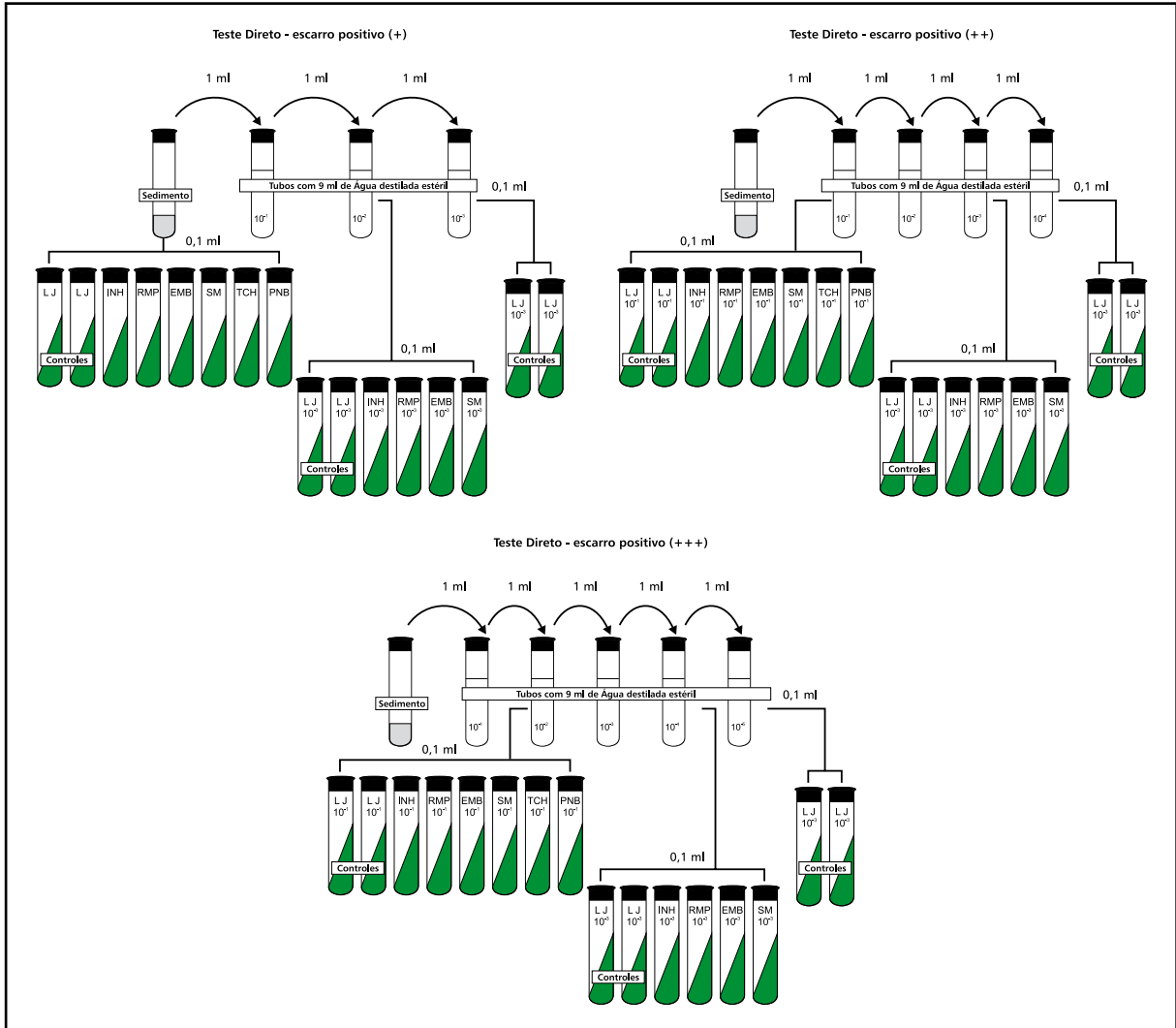
CCC = Controle de Crescimento da Cepa CM = Controle de Esterilidade do Meio
SM = estreptomicina, INH = isoniazida, EMB = etambutol, RMP = rifampicina,
RB = rifabutina, CIP = ciprofloxacina, AK = amikacina CLA = claritromicina

9.12.2 Figuras e Fluxogramas

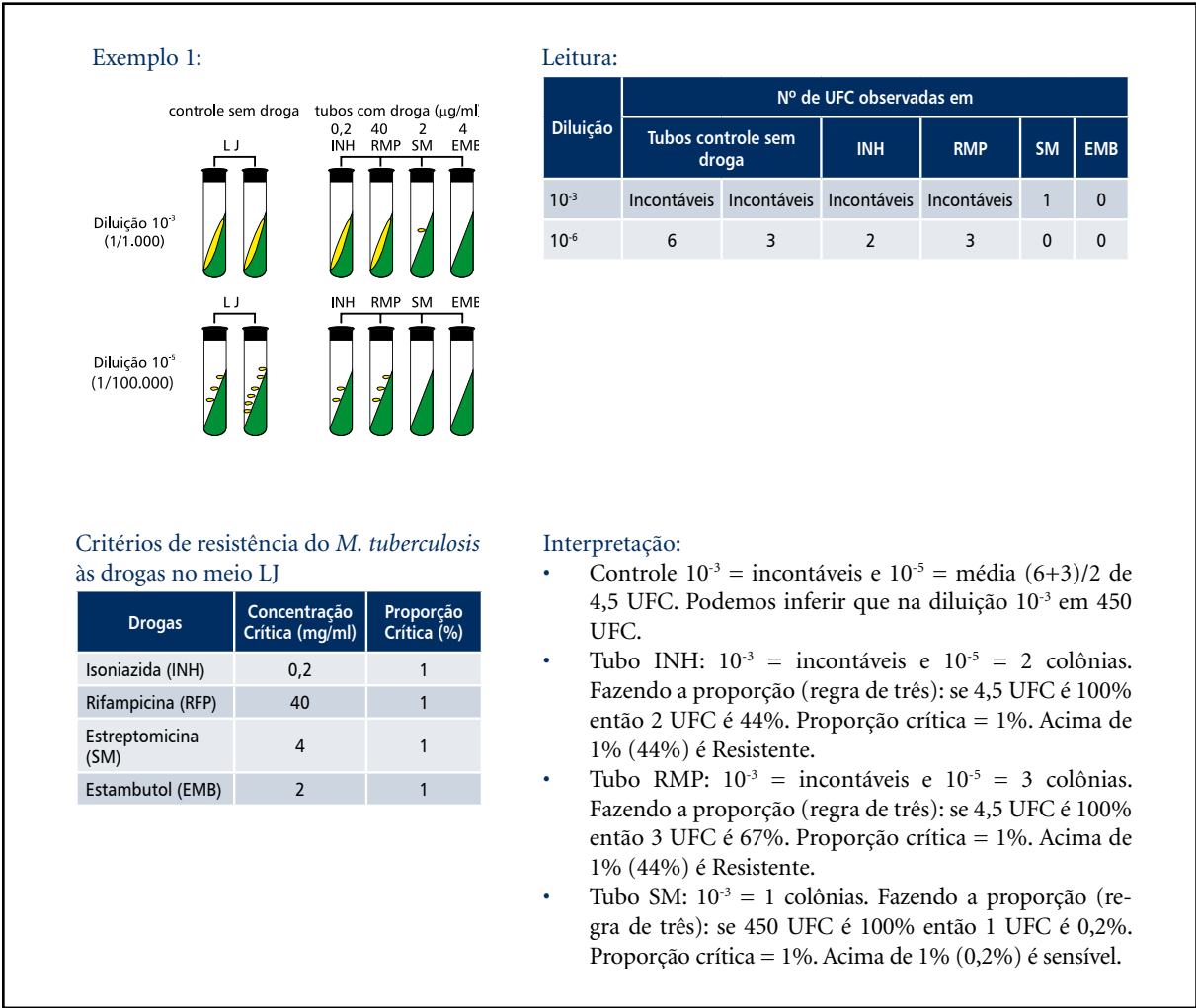
9.12.2.1 Figura 1 – Fluxograma de Realização do Método das Proporções em LJ – teste indireto



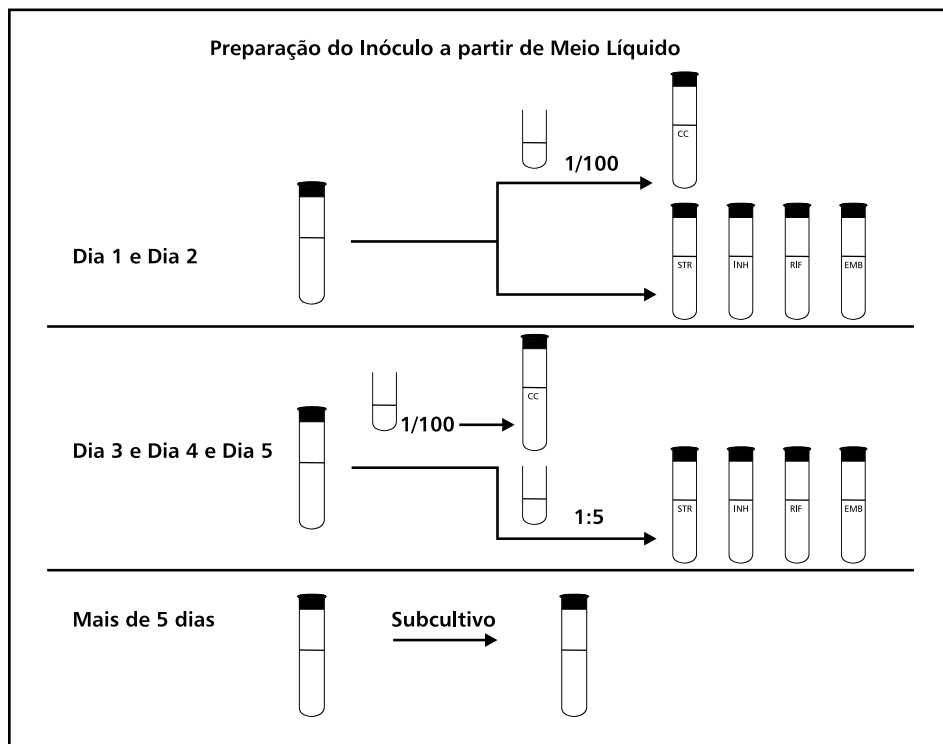
9.12.2.2 Figura 2 – Fluxograma de Realização do Método das Proporções em LJ – teste direto



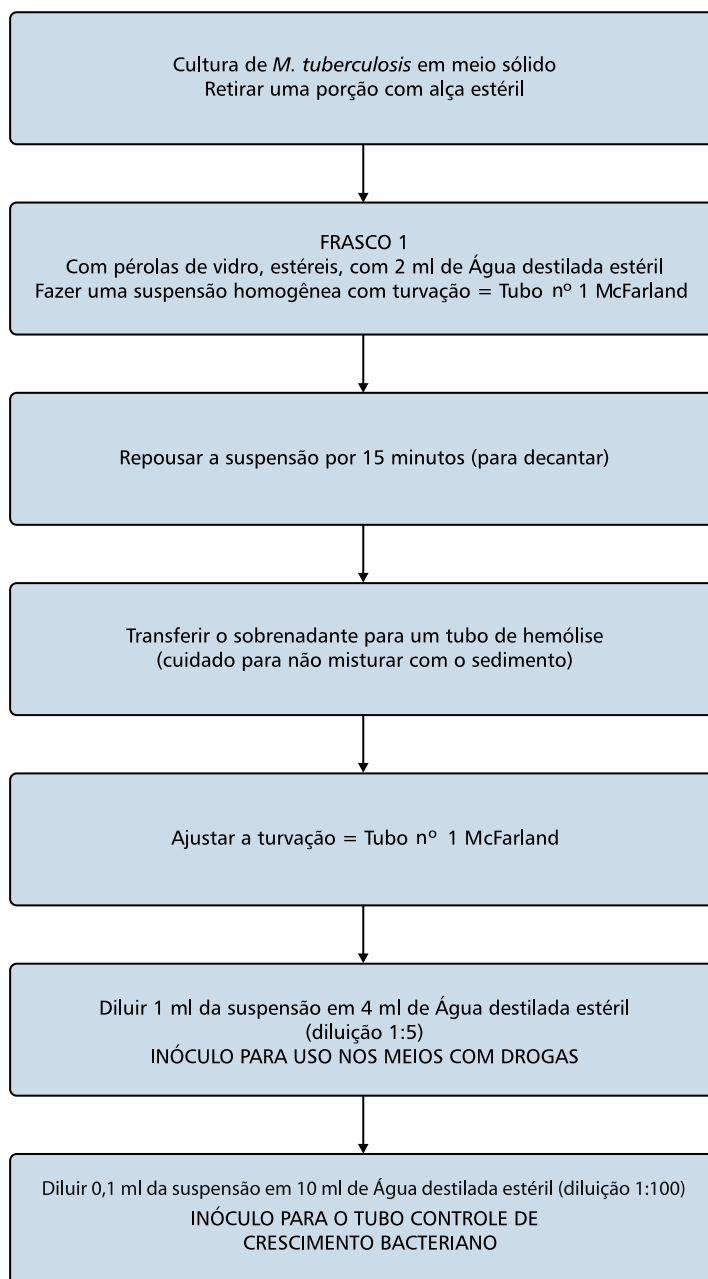
9.12.2.3 Figura 3 – Fluxograma de Leitura do Método das Proporções em LJ



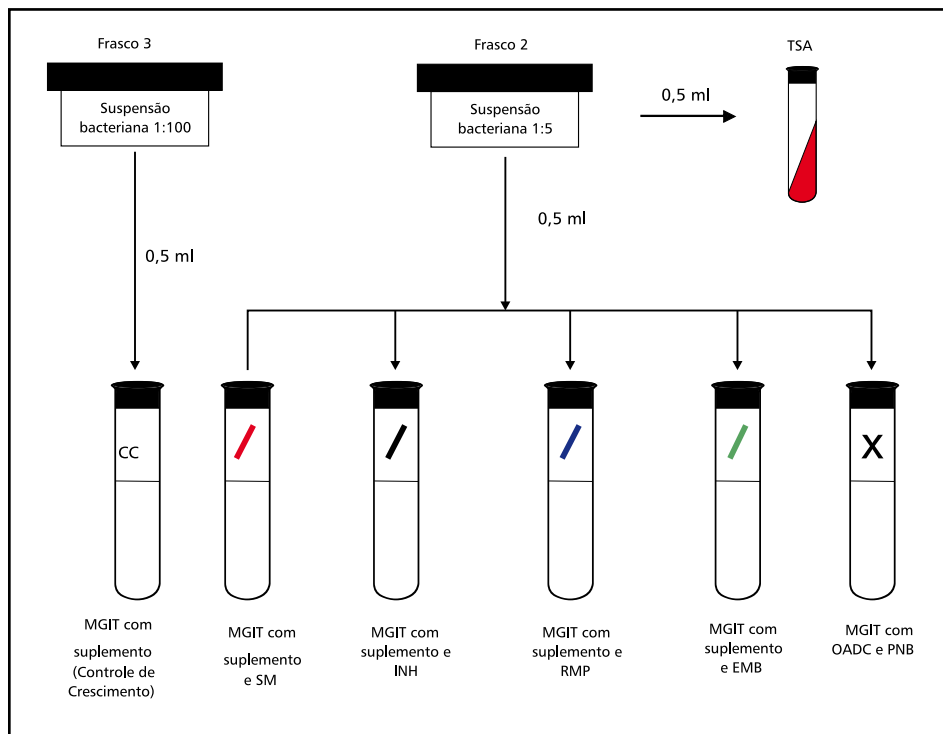
9.12.2.4 Figura 4 – Fluxograma de Preparação do Inóculo a partir de Meio Líquido para o Método Automatizado MGIT



9.12.2.5 Figura 5 – Fluxograma de Preparação do Inoculo a partir de Meio Sólido para o Método Automatizado MGIT



9.12.2.6 Figura 6 – Fluxograma de Inoculação para o Método Automatizado MGIT



9.12.3 Formulários do CQI do TS

9.12.3.1 Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de INH



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

**Formulário – Controle da Preparação
da Solução-mãe de INH**

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Isoniazida			
Água destilada estéril			

Nome químico = Isonicotinic acid hydrazide = Isonicotinic hydrazide

☐ Embalagem é a original	☐ Foi fracionada	Quem enviou:	Data do recebimento:
☐ Rótulo possui as informações necessárias		☐ Certificado de qualidade do fabricante	

Conservação:

☐ Geladeira	☐ Freezer	☐ Ambiente	☐ Em dessecador
------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	--

Pesagem (g) / volume (ml)

Substância	Quantidade
Isoniazida	
Água destilada	

Pesagem Balança - Marca:

Responsável:

Conservação da Solução-Mãe

☐ Aliquotas em criotubos	Quantos criotubos:
☐ Freezer -20°C	☐ Freezer -70°C

Observações:

Responsável:

Data da execução:

9.12.3.2 Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de RMP



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de RMP

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Rifampicina			

Nome químico = (3-[4-Methylpiperazinyliminomethyl]rifamycin SV= Rifamycin AMP = Rifampin)

☐ Embalagem é a original	☐ Foi fracionada	Quem enviou:	Data do recebimento:
☐ Rótulo possui as informações necessárias		☐ Certificado de qualidade do fabricante	

Conservação:

☐ Geladeira	☐ Freezer	☐ Ambiente	☐ Em dessecador
------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	--

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Isoniazida	
Água destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	

Conservação da Solução-Mãe	
☐ Aliquotas em criotubos	Quantos criotubos:
☐ Freezer -20°C	☐ Freezer -70°C
Observações:	
Responsável:	
Data da execução:	

9.12.3.3 Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de EMB



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de EMB

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Etambutol			
Água destilada estéril			

Nome químico = (2,2'-[1,2-Ethanediyldiimino]bis-1-butanol dihydrochloride = Ethambutol dihydrochloride)

☐ Embalagem é a original	☐ Foi fracionada	Quem enviou:	Data do recebimento:
☐ Rótulo possui as informações necessárias		☐ Certificado de qualidade do fabricante	

Conservação:

☐ Geladeira	☐ Freezer	☐ Ambiente	☐ Em dessecador
------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	--

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Isoniazida	
Água destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	

Conservação da Solução-Mãe	
☐ Aliquotas em criotubos	Quantos criotubos:
☐ Freezer -20°C	☐ Freezer -70°C
Observações:	
Responsável:	Data da execução:

9.12.3.4 Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de SM



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação
da Solução-mãe de SM

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Estreptomicina			
Água destilada estéril			

Nome químico = (Dihydrostreptomycin sesquisulfate)			
☐ Embalagem é a original	☐ Foi fracionada	Quem enviou:	Data do recebimento:
☐ Rótulo possui as informações necessárias		☐ Certificado de qualidade do fabricante	
Conservação:			
☐ Geladeira	☐ Freezer	☐ Ambiente	☐ Em dessecador

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Isoniazida	
Água destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	

Conservação da Solução-Mãe	
☐ Alíquotas em criotubos	Quantos criotubos:
☐ Freezer -20°C	☐ Freezer -70°C
Observações:	
Responsável:	Data da execução:

9.12.3.5 Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de TCH



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação da Solução-mãe de TCH

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
TCH			
Água destilada estéril			

Nome químico = Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2-Thiophenecarboxylic acid hydrazide)

☐ Embalagem é a original	☐ Foi fracionada	Quem enviou:	Data do recebimento:
☐ Rótulo possui as informações necessárias		☐ Certificado de qualidade do fabricante	

Conservação:

☐ Geladeira	☐ Freezer	☐ Ambiente	☐ Em dessecador
------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	--

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Isoniazida	
Água destilada	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	

Conservação da Solução-Mãe	
☐ Aliquotas em criotubos	Quantos criotubos:
☐ Freezer -20°C	☐ Freezer -70°C
Observações:	
Responsável:	Data da execução:

9.12.3.6 Formulário – Controle da Incorporação da Droga no Meio LJ



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Incorporação da Droga no Meio LJ

Nº Lote de TS =							
LJ + Droga	Droga				LJ	Incorporação ao Meio LJ	Coagulador:
	Solução-mãe	Solução de Uso		Responsável pela Diluição:			
	Data produção	1ª Diluição: diluente	2ª Diluição: diluente				
LJ + INH						Responsável:	Responsável:
	Observações:						
LJ + RMP						Responsável:	Responsável:
	Observações:						
LJ + EMB						Responsável:	Responsável:
LJ + SM						Responsável:	Responsável:
	Observações:						
LJ + PNB						Responsável:	Responsável:
	Observações:						
LJ + TCH						Responsável:	Responsável:
	Observações:						

9.12.3.7 Formulário – Controle da Preparação do Meio Líquido Middlebrook 7H9 com OADC



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário – Controle da Preparação do Meio Líquido Middlebrook 7H9 com OADC

Data da Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Nº do Lote Produzido

Substância	Procedência	Nº do Lote Fabricante	Validade
Middlebrook 7H9			
Água destilada estéril			
Glicerol			
OADC			
Bacto-Casitone			

Pesagem (g) / volume (ml)	
Substância	Quantidade
Middlebrook 7H9	
Água destilada estéril	
Glicerol	
OADC	
Bacto-Casitone	
Pesagem Balança - Marca:	
Responsável:	

Meio Líquido Base			
Esterilização Autoclave - Equipamento Marca:			
Temperatura	Tempo	Pressão	☐ Aprovado ☐ Reprovado
Responsável:			

Preparação Meio Líquido 7H9 com OADC	
Substância	Quantidade
7H9 Base	
OADC	
Data:	Responsável:

CONSERVAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

10.1 Descrição

A conservação de micobactérias nos laboratórios de micobacteriologia é fundamental para a organização de coleção de cepas desse microrganismo¹. A criação dessas coleções serve a vários objetivos, como o de manter cepas viáveis bioquimicamente representativas e caracterizadas com relação à sua taxonomia, infectividade e virulência². Serve ainda como padrão de referência interno nos procedimentos de controle de qualidade de rotina diagnóstica e de pesquisas relacionadas a estes microrganismos.

Culturas de microrganismos são freqüentemente mantidas em meios sólidos sendo necessário subcultivos periódicos. Esse tipo de conservação tem muitas desvantagens como excesso de trabalho, contaminações e seleção de mutantes. Um bom método de conservação deve apresentar baixo custo, manter as características genéticas do microrganismo e principalmente a sua viabilidade. Os métodos mais comumente utilizados para este propósito são: congelamento de cepas e isolados bacterianos em meio de líquido acrescido de um crioprotetor, tal como o glicerol^{3,4}, e congelamento em miçangas, ambos utilizando o congelador de temperatura -20°C ou -70°C para manutenção das cepas congeladas. Quanto mais baixa a temperatura de manutenção das cepas e/ou isolados bacterianos congelados, isto é -70°C ou -196°C (temperatura do nitrogênio líquido), mais longo seu tempo de sobrevivência⁵.

10.2 Métodos de congelamento

10.2.1 Congelamento de culturas de micobactérias em meio líquido a -70°C^{4, 5}

Precauções

A manipulação das culturas para o congelamento deve ser realizada em CSB.

As cepas devem ser congeladas com 3 a 4 semanas de incubação.

A manipulação incorreta dos congeladores a -20°C ou -70°C acarreta risco de queimaduras e ferimentos graves ao manipulador por isso utilize luvas para baixas temperaturas.

Fazer o controle de qualidade da temperatura dos congeladores -20°C ou -70°C diariamente, para manter a viabilidade das cepas congeladas.

Materiais

Equipamentos

- CSB.
- Congelador/freezers a -20°C ou a -70°C.

Reagentes

- Meio de congelamento – Meio líquido Middlebrook 7H9 com OADC e 10% de glicerol, o preparo do meio 7H9 está descrito no item 10.5.3.1 dos anexos deste Capítulo.

Insumos

- Criotubos de polipropileno de 2,0 ml (próprios para suportar temperaturas baixas) com tampa de rosca, estéril, devidamente identificados com os números das culturas a serem congeladas.
- Alças descartáveis estéreis.
- Suporte para criotubos.
- Caixas de poliestireno numeradas para armazenamento dos criotubos nos congeladores.
- Caneta indelével, de retroprojektor escrita fina.
- Culturas puras de micobactérias em meio sólido.

Procedimentos

A – Preparo das cepas a serem congeladas

- Identificar os criotubos com os números dos isolados bacterianos ou nome das cepas a serem congelados como demonstra a Figura 1.
- Colocar 1 ml de meio de congelamento em cada criotubo.
- Retirar 2 alçadas bem cheias do crescimento micobacteriano de cada cultura em meio sólido a serem congeladas..
- Transferir para o criotubo contendo o meio de congelamento.
- Girar a alça dentro do meio para se certificar que todas as colônias foram transferidas para o meio.
- Fechar bem a tampa do criotubo.
- Acondicionar os criotubos nos poços da caixa de poliestireno, conforme descrito na Figura 2.
- Registrar no Formulário de Localização das Cepas Congeladas o número de identificação do criotubo a ser congelado, no quadrado correspondente ao poço em que o mesmo será colocado. O Formulário de Localização das Cepas Congeladas é apresentado no item 10.5.1 dos anexos deste Capítulo.

Figura 1 Identificação do criotubo para congelamento de isolados bacterianos

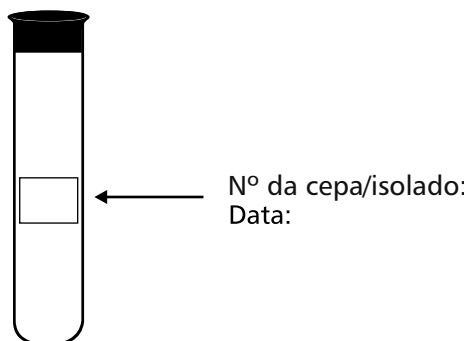
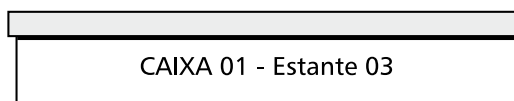


Figura 2 Identificação da caixa onde são acondicionados os criotubos



B – Congelamento

- Registrar no Formulário de Registro de Amostras Congeladas, o número da caixa, o número da amostra, o número do poço, o meio de cultura utilizado, o lote do meio de cultura e a data do congelamento de cada cepa a ser congelada, em cada coluna respectivamente. O Formulário de Registro de Amostras Congeladas é apresentado no item 10.5.2 dos anexos deste Capítulo.
- Levar imediatamente as caixas contendo os criotubos com as cepas, devidamente registradas, para o congelador -70°C.

C – Recuperação das cepas congeladas

- Localizar a cepa que se deseja descongelar no Formulário de Registro de Amostras Congeladas. O Formulário de Registro de Amostras Congeladas é apresentado no item 10.5.2 dos anexos deste capítulo.
- Retirar o criotubo desejado do congelador e colocar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para que descongele rapidamente.
- Guardar a caixa novamente no congelador o mais rápido possível.
- Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirar um pouco da suspensão bacteriana e inocular em um frasco contendo meio sólido de LJ ou OK.
- Incubar a $36^\circ\text{C} \pm 1$ e acompanhar semanalmente o crescimento do subcultivo.

ATENÇÃO:

1. Verificar se as características das colônias são coincidentes com as esperadas para a espécie.
2. Verificar a ausência de contaminantes realizando um esfregaço da colônia conforme descrito no Capítulo 8 e corando pelo método de Ziehl-Neelsen conforme descrito no Capítulo 6 deste manual.
3. Realizar a Identificação fenotípica ou molecular, conforme descrito no Capítulo 8.

Interpretação de resultados

Cepa viável: crescimento de colônias de micobactérias nos meios semeados.

Cepa inviável: quando não há crescimento nos meios semeados.

10.2.2 Conservação de cepas/isolados bacterianos utilizando miçangas.

Precauções

A manipulação das culturas para o congelamento deve ser realizada em CSB.

As precauções da conservação de cepas utilizando miçangas estão descritas no item 10.2.1 deste Capítulo.

Materiais

Reagentes

- Meio de Sauton com 10% de glicerol, o preparo do meio de Sauton está descrito no item 10.5.3.2 dos Anexos deste capítulo.
- Meio de Löwenstein-Jensen (LJ).
- Meio de Löwenstein-Jensen com piruvato de sódio (LJ-piruvato).
- Meio de Middlebrook 7H9 com OADC.

Insumos

- Criotubo de polipropileno de 2 ml, com tampa de rosca, estéril, descartável.
- Miçangas de vidro perfuradas, sem corantes, com aproximadamente 2 mm de diâmetro.
- Alça descartável estéril.
- Pipeta Pasteur estéril.
- Suporte para criotubos.
- Etiquetas auto-adesivas laminadas (redonda e retangular), resistente a congelamento.
- Caneta indelével, de retroprojeto escrita fina.

Preparo do criotubo

- Mergulhar as miçangas em detergente neutro deixando-as imersas por um dia.
- Enxaguar muito bem com água corrente.
- Secar na estufa.
- Colocar de 6 a 10 miçangas em cada criotubo e acondicionar em frascos de vidro. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 127°C.
- Distribuir, assepticamente, 0,5 ml de meio de Sauton com 10% de glicerol nos criotubos.
- Identificar os criotubos utilizando uma etiqueta auto-adesiva laminada na lateral e outra na tampa, escrevendo de maneira bem legível o número da cepa (utilizar uma caneta retroprojeto escrita fina permanente).

Procedimento

A – Preparo das cepas a serem conservadas

- Com uma alça descartável estéril, colocar uma boa massa bacteriana no criotubo e homogeneizar no meio de Sauton.
- Com a própria alça descartável agitar, com cuidado, as miçangas para que saia o ar e para que as miçangas fiquem totalmente embebidas na suspensão de bacteriana.
- Fechar bem os criotubos. Deixá-los em repouso por, no mínimo, 15 minutos.
- Retirar todo o meio líquido com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, utilizando uma pipeta para cada cepa/isolado bacteriano.
- Colocar os criotubos em caixas apropriadas e numeradas.
- Registrar no Formulário de Localização das Cepas Congeladas a posição das cepas/isolados bacterianos nas caixas. Modelo de formulário é apresentado no item 10.5.1 dos anexos deste Capítulo.

B – Congelamento

- Registrar o número da caixa, o número da amostra, o meio de cultura utilizado, o lote do meio de cultura e a data do congelamento de cada cepa a ser congelada, em cada coluna respectivamente no Formulário de Localização das Cepas Congeladas, este é apresentado no item 10.5.2 dos anexos deste capítulo.
- Levar imediatamente as caixas contendo os criotubos com as cepas, devidamente registradas, para o congelador -70°C.

C – Recuperação de cepas a partir das miçangas

- Localizar a cepa que se deseja descongelar no Formulário de Registro Amostras Congeladas. Modelo deste formulário está descrito no item 10.5.2 dos anexos deste Capítulo.
- Retirar o criotubo desejado do congelador.
- Guardar a caixa novamente no congelador o mais rápido possível.
- Com uma alça descartável estéril, retirar 1 a 2 miçangas e colocar dentro do tubo com o meio de LJ ou 7H9.
- Em meio sólido, esfregar as miçangas sobre a superfície, com auxílio da alça.
- Em meio líquido, colocar a miçanga, fechar muito bem o tubo e agitar o tubo.
- Incubar o tubo a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ e acompanhar semanalmente o crescimento do repique.
- Devolver o criotubo à sua caixa original, na mesma posição no freezer.

Interpretação de resultados

- Cepa viável: crescimento de colônias de micobactérias nos meios semeados.
- Cepa inviável: quando não há crescimento nos meios semeados.

10.3 Manutenção de Cepas Padrão ou Controles de Referência

Para controlar a acurácia e precisão dos testes e exames laboratoriais é preciso utilizar controles de referência nos laboratórios. Os controles de referência são utilizados para a verificação dos resultados obtidos de testes específicos, pois suas características fenotípicas são conhecidas, ou seja, sua identificação e seu perfil de sensibilidade a drogas já foram determinados.

Os controles de referência devem possuir origem confiável, vindo de um LR que realiza testes fenotípicos e moleculares para confirmar sua identificação e perfil de sensibilidade.

Para que esses controles de referência mantenham suas características fenotípicas, eles devem ser mantidos adequadamente nos laboratórios através da realização de cultura estoque e cultura de trabalho, evitando-se assim um número exagerado de subcultivos.

O termo **cultura estoque**⁶ é utilizado para definir o subcultivo das cepas de referência. Essa cultura deve ser armazenada no laboratório de microbiologia em temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ e deve ser descongelada anualmente.

A **cultura de trabalho**⁶ é o subcultivo semanal ou mensal da cultura de estoque que será mantida no laboratório (temperatura ambiente) para realização dos testes diários ou semanais do CQI.

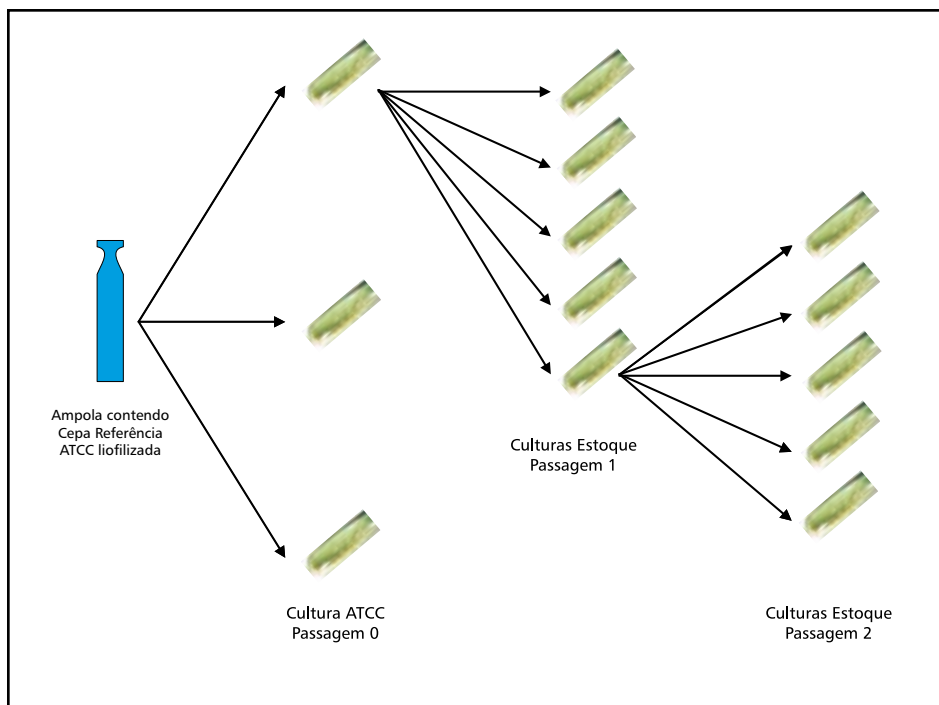
Uma **passagem**⁶ é a transferência do microrganismo de uma cultura viável para um novo meio de cultura, obtendo-se uma cultura viável. A hidratação, ou o descongelamento, de um controle de referência, proveniente do fornecedor, não é considerada uma passagem ou subcultivo. A **primeira passagem** será considerada o subcultivo do controle de referência para a cultura estoque. A transferência do microrganismo da cultura estoque para a cultura de trabalho será a **segunda passagem** como mostra a Figura 3.

Os controles de referência não devem ser submetidos a um grande número de subcultivos, o número máximo ao qual podem ser submetidas é de **cinco passagens**, a partir do controle de referência original⁷. Um número indefinido de passagens pode comprometer principalmente a pureza da cultura e as características fenotípicas de algumas micobactérias.

No caso de armazenamento prolongado, as culturas de referência devem ser mantidas em temperatura mais baixas, por exemplo, em congeladores/*freezers* a -70°C ou em nitrogênio líquido (-196°C) em meio contendo o crioprotetor recomendado.

Os controles padrão ou controles de referência são adquiridos comercialmente de fornecedores como o American Tissue Culture Collection (ATCC)⁸.

Figura 3 Propagação do Controle de Referência



10.3.1 Hidratação da cepa referência original liofilizada⁷

Procedimento

- Ressuspender o controle liofilizado, conforme as recomendações do ATCC, adicionando 0,3 a 0,4 ml de meio de cultura líquido à ampola que contém o controle de referência.
- Homogeneizar bem o conteúdo do frasco.
- Semear o homogeneizado em três frascos contendo meio de cultura sólido específico (LJ e OK descritos no Capítulo 7 deste manual ou Middlebrook 7H10).
- Incubar por 3 a 4 semanas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.
- Fazer um esfregaço das colônias que cresceram no meio específico e corar pelo método de Ziehl-Neelsen, conforme descrito no Capítulo 6 deste manual, para verificar a pureza da cultura.

10.3.2 Preparo das Culturas Estoque – Primeira Passagem

- Se a cultura estiver sem contaminações, fazer 5 subcultivos de cada um dos três frascos de cultura.
- Identificar os 15 frascos com o nome do microrganismo, número do controle de referência, a data do subcultivo e “**cultura estoque**”, **1ª passagem**.
- Incubar os 15 frascos de cultura estoque por 3 a 4 semanas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.
- Após o crescimento, fazer um esfregaço das colônias e corar pelo método de Ziehl-Neelsen para verificar a pureza da cultura.

10.3.3 Preparo das Culturas de Trabalho – Segunda Passagem

- Se a cultura estiver sem contaminações, utilizar parte das colônias dos 15 frascos de cultura estoque para fazer 5 subcultivos de cada um dos 15 frascos de culturas.
- Identificar os 75 frascos com o nome do microrganismo, número do controle de referência, a data do subcultivo e “**cultura de trabalho**”, **2ª passagem**.
- Incubar os 75 frascos por 3 a 4 semanas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.

10.3.4 Congelamento das Culturas Estoque

- Utilizar o restante das colônias dos 15 frascos de culturas estoque para fazer o congelamento.
- Etiquetar cinco criotubos estéreis para cada um dos 15 frascos de cultura estoque, com o nome do microrganismo, número do controle de referência e a data do armazenamento.
- Transferir duas ou três alças do crescimento bacteriano para cada um dos setenta e cinco criotubos contendo 1 ml de meio de congelamento.
- Armazenar os 75 criotubos contendo as culturas estoque em congelador/*freezer* -70°C .

10.3.5 Congelamento das Culturas de Trabalho

- Após as 3 ou 4 semanas de incubação, fazer esfregaço das culturas de trabalho e corar pelo método de Ziehl-Neelsen para verificar a pureza das cultura de trabalho (75 frascos).
- Se a cultura estiver sem contaminações, armazenar o controle de referência.
- Etiquetar cinco criotubos estéreis para cada um dos 75 frascos de cultura de trabalho, com o nome do microrganismo, número do controle de referência e a data do armazenamento.
- Transferir duas ou três alças do crescimento bacteriano para cada um dos criotubos contendo 1 ml de meio de congelamento.
- Armazenar os 375 criotubos contendo as culturas de trabalho em congelador/freezer -70°C.
- Sempre que necessário descongelar um criotubo de cultura de trabalho. Desta cultura poderá ser feito apenas três subcultivos, isto é até a 5ª passagem.
- Para o descongelamento de um frasco de cultura de trabalho siga os passos do procedimento Recuperação das Cepas Congeladas, descrito acima.

10.4 Referências

1. KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. Maintenance of Microorganisms and cultured cells. *A manual of laboratory methods*. Second Edition. Academic Press Limited, London, 1991, 308p.
2. World Federation for Culture Collection. *Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*. 2nd edition, June 1999, 24 p.
3. GROVER, A.A.; KIM, H.K.; WIEGESHAUS, E.H.; SMITH, D.W. Host-Parasite Relationships in Experimental Airborne Tuberculosis II. Reproducible Infection by Means of an Inoculum Preserved at -70°C. *Journal of Bacteriology*, vol 94(4) p 832-835, 1973.
4. KIM, T. & KUBICA, G.P. Preservation of Mycobacteria:100% viability of Suspensions Stored at -70°C. *Applied Microbiology*, vol 25(6), p 956-960. 1973.
5. KUBICA, GP; FILHO, P.P.G. & KIM, T. Preservation of Mycobacteria at -70°C: Persistence of Key Differential Features. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 6(2), p. 149-153.1977.
6. OPAS/Organização Panamericana de Saúde & MS/Ministério da Saúde. Implantação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Tecnologia em Serviços de Saúde. Março – 2006. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais>
7. ATCC/American Tissue Culture Collection. ATCC Thechnical Bulletin nº6. From ATCC Connection 23(2): 6-7, 2003.

8. ATCC/American Tissue American Tissue Culture Collection. How to revive cultures.
Disponível em <http://www.atcc.org/common/technicalInfo/HowToReviveCultures>

10.5 Anexos do capítulo

10.5.1 Formulário de Localização das Cepas Congeladas



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Localização das Cepas Congeladas

Número da Caixa:					Data do Congelamento:			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62	63
64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81

Formulário de Registro de Amostras Congeladas

[illegible]

10.5.3 Meios de cultura

10.5.3.1 Meio de Middlebrook 7H9

O meio de Middlebrook 7H9 é preparado a partir de base disponível comercialmente e suplementado com OADC após a esterilização da base.

Para preparar 1.000 ml de meio dissolver 4,7 gramas do meio base em 800 ml de água deionizada. Adicionar 100 ml de glicerol.

Autoclavar por 15 minutos a 127°C. Aguardar até que esfrie e adicionar 100 ml de OADC.

Armazenar em geladeira. Colocar um rótulo contendo o nome do meio, nº do lote, data do preparo e de validade.

Dependendo da quantidade de cepas congeladas na rotina do laboratório pode-se fazer este meio em menor volume ou fazer 5 alíquotas de 200 ml. Isto evita a contaminação do meio.

10.5.3.2 Meio de Sauton com 10% de Glicerol

L-asparagina	4 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Fosfato bipotássico	0,5 g
Ácido cítrico	2 g
Citrato férrico amoniacal	0,05 g
Glicerol	100 ml
Água destilada qsp	1000 ml

Preparo:

Pesar os sais separadamente e dissolver os componentes em água fervente.

Acertar o pH para 7,2 com NaOH, filtrar em papel de filtro e autoclavar a 121°C/15 min.

Armazenar em geladeira. Colocar um rótulo contendo o nome do meio, nº do lote, data do preparo e de validade.

11.1 Descrição

O uso correto e o monitoramento dos equipamentos presentes nos laboratórios que realizam o diagnóstico da Tuberculose e de Micobacterioses são fundamentais para a qualidade dos exames realizados. O mau uso, a constante utilização ou até mesmo o uso não periódico fazem com que o padrão de desempenho seja perdido. Por esse motivo, é muito importante o monitoramento dos equipamentos. Isso implica executar um conjunto de procedimentos que registrem o desempenho de um determinado equipamento. O profissional de laboratório é responsável não só pela técnica correta de uso, como também pelo monitoramento e a conservação de todos os equipamentos que fazem parte de sua rotina laboratorial.

São recomendações gerais para a instalação e uso dos equipamentos de laboratório¹.

- Realizar o aterramento da rede elétrica.
- Utilizar uma tomada para cada equipamento.
- Anotar a voltagem das tomadas e dos cabos de cada equipamento.
- Treinar os profissionais nos procedimentos de uso (POP – Procedimento Operacional Padrão) e limpeza dos equipamentos.
- Seguir as instruções de instalação contidas nos manuais.
- Manter em local acessível o manual de cada equipamento.
- Evitar o uso de capas plásticas na proteção dos equipamentos, quando os mesmos estão fora de uso. Elas favorecem a condensação de umidade, resultando na oxidação dos componentes elétricos/eletrônicos, bem como o crescimento de fungos. As capas confeccionadas em tecidos que não soltam fibras são as indicadas para esse fim.
- Desligar os equipamentos da rede elétrica antes de qualquer procedimento de limpeza.
- Desinfetar os equipamentos antes de enviá-los à manutenção.
- Fazer contrato de assistência técnica sempre que possível.
- Registrar todos os equipamentos no programa de manutenção preventiva do laboratório.

Conforme o método de diagnóstico, os equipamentos necessários estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 Equipamentos utilizados conforme métodos de diagnóstico de Tuberculose e Micobacterioses

BACILOSCOPIA		
Autoclave	Balança	Capela de Exaustão
Destilador de água	Microscópio	
CULTURA, IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E CONSERVAÇÃO DE CEPAS		
Autoclave	Agitador mecânico	Balança
Cabine de Segurança Biológica	Capela de Exaustão	Coagulador de meio de cultura
Centrífuga	Destilador de água	Dispensador de Meio de cultura
Estufas bacteriológicas	Geladeira e Freezer	Microscópio
Medidor de pH		
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR		
Autoclave	Agitador mecânico	Balança
Banho-Maria	Cabine de Segurança Biológica	Capela de Exaustão
Cuba e Fonte de Eletroforese	Destilador de água	Geladeira e Freezer
Medidor de pH	Micro-Centrífuga	Micropipetadores
Termociclador		
INSTRUMENTO AUXILIAR DE MONITORAMENTO		
Termômetros		

11.2 Equipamentos

11.2.1 Agitador mecânico

Usado para promover a agitação e homogeneização de soluções em tubos (ensaio ou centrífuga) ou microtubos.

Conduas

- Verificar sempre a presença de fissuras nos tubos de ensaio de vidro antes de efetuar a agitação.
- Verificar sempre as condições da borracha do receptáculo de tubo.

Uso

- Selecionar a chave de “agitação contínua” ou “agitação periódica”. No uso da contínua, regular a velocidade desejada girando o potenciômetro e colocar o tubo ou frasco para agitação. Na periódica, o aparelho permanece desligado e

para colocá-lo em funcionamento, basta pressionar o receptáculo de borracha com o próprio tubo a ser agitado.

Monitoramento

- Enviar para assistência técnica credenciada, anualmente, para realização para aferição e ajuste.

11.2.2 Autoclave

A autoclave é um equipamento utilizado para esterilização de materiais e, no caso de ser uma autoclave vertical, não deve estar dentro do laboratório, mas deve estar o mais próximo possível do mesmo². O ideal para o laboratório de tuberculose é a instalação de uma autoclave horizontal (com duas portas), para que o material utilizado na área contaminada seja colocado diretamente na autoclave e, depois de autoclavado, seja retirado pela outra porta para uma área não contaminada.

Para que o processo de esterilização seja eficiente é necessário que todo ar residual seja eliminado do interior da autoclave e que o vapor úmido penetre em todo material a ser autoclavado³. Por isso, é importante que não seja colocado material em excesso.

Os microrganismos patogênicos são mortos mais rapidamente pelo calor úmido (o vapor saturado desnatura as suas proteínas) do que pelo calor seco³. A temperatura mínima deve ser de 121°C e mantida por 15-20 minutos, mas alguns equipamentos automatizados operam a 134°C por 3-5 minutos².

Condutas

- Utilizar pelo menos duas autoclaves, uma para esterilizar reagentes e meios de cultura e outra para o “lixo infeccioso”, antes do mesmo ser encaminhado para a coleta de lixo hospitalar/laboratorial² ou para o local de reciclagem no caso de vidros.

ATENÇÃO: Verificar periodicamente as borrachas de vedação e substituí-las, se necessário, para assegurar a vedação hermética e evitar o escape do vapor de água.

- Instruir todos os usuários para o correto uso da autoclave.
- Manter sempre limpos o cesto e a câmara de autoclavagem; lavar com esponja de aço e sabão, e retirar os resíduos com bastante água¹.
- Trocar a água da câmara de autoclavagem pelo menos uma vez por semana.

Uso

- Verificar se a autoclave está desligada, com o manômetro zerado e sem indício de produção de vapores.
- Abrir a tampa e verificar o nível de água. Se necessário acrescentar água até o nível de trabalho, ou seja, a resistência deve estar submersa.
- Distribuir os materiais no cesto de autoclavação, de forma que a circulação de vapor não seja prejudicada.
- Fechar a tampa. Encaixar e apertar as garras de fechamento firmemente.
- Ligar a chave do equipamento no máximo. Deixar a válvula de exaustão de vapor aberta.
- Aguardar a saída de vapor úmido pela válvula de exaustão. Manter a válvula de exaustão aberta por pelo menos 5 minutos após o início da fervura da água (garante a eliminação total do ar residual). Fechar a válvula de exaustão de vapor.
- Aguardar a autoclave atingir 121°C. Mudar a chave para médio ou mínimo para que seja mantida a temperatura de autoclavação. Marcar o tempo.
- Ao término do tempo, desligar a chave do equipamento e aguardar o seu esfriamento ou a queda total da pressão interna.
- Abrir a válvula de exaustão para garantir a saída de toda pressão interna.
- Desrosquear as garras de fechamento, abrir a tampa e retirar o material autoclavado.
- Deixar esfriar e fechar a tampa.

Monitoramento

- A eficiência do processo de autoclavação pode ser avaliada por controle biológico. Nas esterilizações por vapor úmido deve ser utilizada qualquer apresentação comercial de *Bacillus stearothermophilus*¹. Essa é submetida à autoclavação e posteriormente seu conteúdo é semeado em meio de cultura apropriado para verificação de desenvolvimento. Caso haja desenvolvimento do bacilo, deve-se solicitar calibração por assistência técnica credenciada. Esse controle biológico deve ser realizado pelo menos uma vez no mês, preferencialmente quando o equipamento estiver com a sua carga máxima de sua capacidade.
- O ajuste da autoclave deve ser realizado por assistência técnica credenciada pelo menos uma vez ao ano.

11.2.3 Balanças

Podem ser mecânicas ou eletrônicas¹ e são usadas para pesar as substâncias que compõem os reagentes e soluções. Para quantidade máxima de 200 g deve ser utilizada balança analítica, com intervalo de leitura de 0,0001g. Acima dessa quantidade, deve-se utilizar balança semi-analítica, com intervalo de leitura de 0,1g, 0,01g ou 0,001g.

As balanças devem ser ajustadas por uma empresa credenciada no local onde está ou será instalada. Para instalação ou uso devem ser observados os seguintes critérios de:

Condutas

- Instalar em bancadas de alvenaria com tampo de concreto, mármore ou granito, longe de equipamentos que causem vibrações ou correntes de ar e não encostar em paredes¹.
- Nivelar a balança antes do uso e da aferição.
- Limpar delicadamente a balança após o uso, com auxílio de um pincel de cerdas macias.
- Não fazer pesagens diretamente sobre o prato da balança. Usar papel ou recipientes próprios para pesagem⁴. Estes, não podem reagir com a substância a ser pesada.
- Determinadas substâncias requerem o uso de EPI para serem manipuladas durante a pesagem.

Uso da balança mecânica¹

- Tarar (zerar) a balança.
- Pesar o papel ou recipiente de pesagem. Anotar o peso.
- Somar o peso do papel ao peso da substância a ser pesada. O valor encontrado é o total a ser pesado.
- Travar a balança, marcar ou adicionar o peso correspondente ao valor final.
- Destruar a balança e adicionar a substância até que a escala da balança atinja o valor total determinado.

Uso da balança eletrônica¹

- Ligar a balança e aguardar pelo menos 30 minutos para estabilizá-la.
- Colocar o papel ou recipiente de pesagem no prato da balança.
- Tarar a balança, descontando o peso do papel ou recipiente de pesagem.
- Adicionar a substância a ser pesada até alcançar o valor desejado.

Monitoramento

- Deve ser realizado pela pesagem de um “peso padrão” – objeto de aferição, com uma carga determinada e conhecida. As balanças que indicarem peso diferente ao do “peso padrão” devem ser encaminhadas para ajuste em uma assistência técnica credenciada.

11.2.4 Banho-maria

Os banhos-maria são equipamentos utilizados em alguns testes bioquímicos de identificação de micobactérias. São projetados para trabalhar na temperatura requerida por determinada técnica e possuem tampa para evitar a perda de calor e a evaporação excessiva da água. Essas tampas devem ser inclinadas para que a água da condensação não goteje sobre o que está sendo incubado³.

Condutas

- No uso primário ou após limpeza encher o reservatório com água destilada.
- Desligar o banho-maria da tomada sempre que realizar a limpeza e nunca fazê-la diretamente sob a água corrente. Mensalmente ou sempre que houver depósitos ou incrustações, lavar as partes metálicas com esponja de aço e sabão neutro enxaguando com bastante água¹.
- Ter cuidado com toques involuntários durante a limpeza da bancada ou uso do próprio equipamento para não alterar a posição do termostato¹.

Uso

- Verificar se o nível de água está cobrindo a resistência e o sensor do termômetro. Caso seja necessário acrescentar água destilada ou deionizada até o nível de trabalho.
- Ajustar o termostato para a temperatura desejada, sempre observando o limite de temperatura de trabalho do equipamento.
- Utilizar o equipamento somente quando a temperatura estiver estabilizada.
- Manter sempre o banho-maria tampado durante o uso para evitar variação da temperatura e evaporação da água.

Monitoramento

- Durante o uso, verificar a temperatura antes e durante o processo de incubação, utilizando um termômetro de leitura pontual ou instantânea.
- Após pernoite ligado e sem uso, medir a temperatura antes do processo de incubação e anotar o resultado no Formulário de Monitoramento – Banho-maria. O Formulário de Monitoramento – Banho-maria é apresentado no item 11.4.1 nos anexos deste Capítulo.

11.2.5 Cabine de Segurança Biológica (CSB)

É o equipamento mais importante em um laboratório que realiza o isolamento e a identificação do *M. tuberculosis*. As CSB foram projetadas para evitar a dispersão de aerossóis de materiais perigosos para o ambiente de trabalho. A CSB Classe II, tipos B2 ou B3 é ideal para o uso em laboratórios de microbiologia - micobactérias, pois

oferece proteção ao técnico, ao ambiente e ao produto manipulado³. Nessa, o ar filtrado da área de trabalho da CSB forma uma “cortina” ou barreira de ar na janela frontal, que impede a entrada de partículas contaminantes do ambiente do laboratório e a dispersão de aerossóis de dentro da CBS para o ambiente do laboratório².

Conduatas

- Instalar a CSB em um local distante da entrada principal do laboratório, já que o trânsito de pessoas próximas ao equipamento pode causar interferência na cortina de ar da janela frontal. O mesmo pode ocorrer quando a CSB está próxima às janelas abertas ou equipamentos que podem proporcionar movimentação de ar³, exemplo: centrífugas.
- Não utilizar bico de Bunsen no interior da CSB devido ao risco de interferência no fluxo de ar interno e danos ao filtro HEPA.

Uso

- Desinfetar as paredes internas e a superfície da área de trabalho com gaze, papel-toalha ou pano umedecido com Solução de Álcool a 70%.
- Cobrir a bancada com papel de filtro ou outro papel absorvente cuidando para não obstruir os orifícios do fluxo de ar.
- Colocar somente o material necessário no interior da CSB. O excesso de material ou equipamento no interior da CSB pode causar interferência no fluxo de ar ou contaminação cruzada.
- Ligar a CSB e a lâmpada germicida UV pelo menos 20 minutos antes de iniciar seu uso.
- Desligar a lâmpada UV e ligar a lâmpada fluorescente. Introduzir as mãos e antebraços na CSB, aguardar pelo menos 60 segundos e dar início às manipulações.
- Evitar a manipulação dos materiais com gestos bruscos para não alterar o fluxo de ar.
- Manter saco plástico autoclavável no interior da CSB para o descarte de material contaminado. Ao término do trabalho, adicionar pequena quantidade de água (para assegurar a geração de calor úmido durante a autoclavação) e fechá-lo hermeticamente.
- Esperar 5 minutos após o término das manipulações para desligar a CSB e proceder aos passos seguintes.
- Abrir a janela de vidro frontal. Retirar todo o material. Desinfetar as paredes internas e a superfície da área de trabalho com gaze, papel-toalha ou pano umedecido com Solução de Álcool a 70%. Ligar a lâmpada UV por 30 minutos.

- Desligar a lâmpada UV e registrar o uso da CSB. O Formulário de Registro de Uso – Cabine de Segurança Biológica (CSB) é apresentado no item 11.4.2 nos anexos deste Capítulo.

Monitoramento

- Deve ser executado pelo fabricante ou assistência técnica credenciada. Inclui testes de velocidade do ar, perda de pressão dos filtros HEPA, contagem de partículas e eficiência dos filtros. A troca do filtro deve ser realizada quando houver o acionamento do alarme de saturação ou após 18-24 meses de uso. Antes de qualquer procedimento da assistência técnica, realizar a desinfecção². O procedimento consta em ferver formalina e água para liberar formaldeído. A água é necessária para manter a umidade relativa em torno de 70%, na qual o gás tem o máximo efeito antimicrobiano. Proceder conforme a seguir:
 - Usar EPI conforme descrito no Capítulo 3.
 - Colocar uma placa aquecedora no interior da CSB.
 - Preparar em um copo de Becker 25 ml de formalina e 25 ml de água. Colocá-lo sobre a placa aquecedora e ligar a mesma.
 - Lacrar a abertura frontal com plástico ou outro material impermeável usando fita auto-adesiva para selar.
 - Ligar a CSB por apenas 15 segundos quando metade da mistura evaporar para que o formaldeído seja aspirado e alcance o filtro HEPA.
 - Desligar a placa aquecedora quando toda a mistura tiver evaporado e ligar a CSB novamente por 15 segundos.
 - Esperar no mínimo 6 horas, descolar parcialmente o plástico que cobre a abertura frontal e ligar a CSB para exaurir o formaldeído.
 - Remover totalmente a cobertura da janela frontal após 5 minutos, mantendo-a ligada por mais 30 minutos para exaurir o formaldeído restante.

ATENÇÃO: Esse procedimento é seguro para as CSB que possuem exaustão para o ambiente externo. Naquelas em que o ar é recirculado para o próprio ambiente de trabalho, será necessário isolar/selar a sala onde a CSB se encontra.

11.2.6 Capela de Exaustão (CE)

Usado para a manipulação segura de reagentes químicos voláteis protegendo o técnico de vapores tóxicos. É importante que a CE tenha uma exaustão suficiente para a geração de pressão negativa em seu interior, não permitindo o escape de vapores tóxicos para o ambiente do laboratório.

Conduta

- Planejar e instalar a CE em local amplo e arejado.
- Evitar o armazenamento de produtos químicos na CE, mesmo daqueles que são utilizados mais frequentemente.

Uso

- Colocar somente o material necessário e produtos químicos no interior da CE. O excesso de material ou produtos em seu interior pode aumentar as chances de acidentes.
- Ligar a CE e a iluminação interna. Verificar a presença de pressão negativa.
- Fechar a janela frontal deixando espaço apenas para a introdução das mãos e antebraços.
- Evitar a manipulação dos produtos químicos com gestos bruscos.
- Manter a CE ligada por 5 minutos após o término das manipulações para que o equipamento remova todo resíduo de vapor tóxico que porventura ainda esteja em suspensão.
- Abrir a janela de vidro frontal. Retirar todos os materiais e produtos químicos.
- Desligar a CE e registrar o uso. O Formulário de Registro de Uso – Cabine de Exaustão (CE) para registro é apresentado no item 11.4.3 nos anexos deste Capítulo).
- Limpar as paredes internas e a superfície da área de trabalho com gaze, papel-toalha ou pano umedecido com água.

Monitoramento

- Contatar o fabricante ou assistência técnica credenciada caso haja a perda da capacidade de exaustão ou qualquer outra anormalidade observada em seu funcionamento.

11.2.7 Centrífuga e microcentrífuga

São utilizadas principalmente para concentrar os bacilos ou seus ADN. É recomendado que as centrífugas tenham rotor de ângulo fixo, o qual permite a centrifugação de tubos ou microtubos com uma pequena diferença de peso sem causar vibração excessiva e a ruptura dos mesmos³.

11.2.7.1 Centrífuga

Para a cultura, a centrífuga deve, preferencialmente, ser refrigerada e capaz de atingir pelo menos 3000 x g, caso contrário, muitas micobactérias permanecerão em suspensão e serão descartadas junto com o sobrenadante³. É imprescindível que as centrífugas tenham caçapas seladas, que evita a dispersão de aerossol caso haja a que-

bra de algum tubo durante a centrifugação. Os equipamentos que possuem rotor de ângulo móvel requerem um balanceamento mais preciso dos tubos.

ATENÇÃO: g é a força centrífuga relativa (FCR), o que é diferente de rotações por minuto (rpm).

Em alguns equipamentos pode-se selecionar diretamente a FCR desejada, de modo que a centrifugação tenha o máximo de rendimento. Entretanto, a maioria das centrífugas indica apenas as rpm que o equipamento alcança. Para calcular a rpm correspondente a 3000 x g utilizar a seguinte fórmula:

$$rpm = 10^5 \times \sqrt{\frac{FCR}{1,118 \times R_{\max}(cm)}}$$

onde $R_{\max}$ = é o raio da centrífuga correspondendo a medida da distância (em cm), em linha reta e perpendicular, do centro do rotor até o fundo do recipiente onde é colocado o tubo de centrífuga.

Por exemplo: se a centrífuga possui um **raio** ($R_{\max}$) de **15 cm** e fornece a velocidade apenas em rpm e você deseja saber quantas rpm são necessárias para obter uma FCR de **3000 x g**, substitua na fórmula os valores correspondentes:

$$rpm = \sqrt{\frac{100.000 \times 3000}{1,118 \times 15}} \Rightarrow rpm = \sqrt{\frac{100.000 \times 3000}{16,77}}$$

$$rpm = \sqrt{100.000 \times 178,89} \Rightarrow rpm = \sqrt{17.889.000}$$

$$rpm = 4.229$$

ATENÇÃO: Em centrífugas com rotor de ângulo móvel, a medida do $R_{\max}$ é realizada com a centrífuga parada e levantando-se o recipiente de tubos até a posição horizontal.

Conduitas

- Lubrificar as partes móveis da centrífuga de acordo com o manual de instruções.
- Lavar as caçapas das centrífugas semanalmente com água e sabão, quando for possível separá-las do rotor.

- Desinfetar, mensalmente, a parte interna da centrífuga e o rotor com um pano umedecido com Solução de Álcool a 70%. Em alguns modelos de centrífuga, o equipamento indica automaticamente o momento de se realizar a desinfecção do rotor e das caçapas que podem ser, inclusive, autoclavados.

Uso

- Balancear, dentro da CSB, os tubos a serem centrifugados, ou seja, deixá-los com o mesmo volume. Se possível, utilizar uma balança para tarar tubos.
- Encaixar, dentro da CSB, os tubos nas caçapas, de modo que aqueles que possuem o mesmo volume fiquem em posição diametralmente oposta. Selar as caçapas com as tampas anti-aerossol.
- Acondicionar as caçapas seladas no rotor, fechar a tampa da centrífuga. Selecionar a FCR ou as rpm desejadas, o tempo de centrifugação e a temperatura⁵ aconselhada de 4 a 7°C.
- Esperar a parada completa da centrífuga para abrir a sua tampa.
- Retirar as caçapas e levá-las para o interior da CSB.
- Abrir as caçapas, retirar os tubos de centrífuga e colocá-los em suporte adequado.

Monitoramento:

- Pelo menos uma vez ao ano ou após qualquer serviço de manutenção, enviar para assistência técnica credenciada. Nas centrífugas não refrigeradas deve ser feita a aferição da rotação, do temporizador e do tacômetro (se houver). Nas centrífugas refrigeradas, além dos itens citados deve ser feita também a aferição do termômetro.

11.2.7.2 Microcentrífuga

É utilizada para os testes moleculares de identificação. Pode ou não ser refrigerada, porém deve ter um rotor de ângulo fixo devido à elevada força centrífuga relativa (FCR), que pode alcançar acima de 12000 x g. Como na centrífuga convencional, em alguns modelos pode-se selecionar diretamente a FCR desejada e nas que indicam apenas rpm a mesma pode ser calculada de acordo com a fórmula apresentada no item 11.2.7.1

Conduitas

- Lubrificar as partes móveis da microcentrífuga de acordo com o manual de instruções.
- Desinfetar, mensalmente, a parte interna do equipamento e o rotor com um pano umedecido com Solução de Álcool a 70%. A preparação e o Formulário de Controle da Preparação da Solução de Álcool à 70% estão descritos no capítulo

3. Em alguns modelos de microcentrífuga, há indicação automática para a realização da desinfecção do rotor que pode ser, inclusive, autoclavado.

- Deixar sempre a tampa do rotor rosqueada ou travada. Isso evitará danos ao rotor se o mesmo for acionado acidentalmente.

Uso

- Ligar a microcentrífuga. Se for refrigerada, ligá-la pelo menos 15 minutos antes da primeira centrifugação, selecionando a temperatura desejada.
- Balancear os microtubos a serem centrifugados, ou seja, deixá-los com o mesmo volume.
- Acondicionar os microtubos no rotor, de modo que aqueles que possuem o mesmo volume fiquem em posição diametralmente oposta. Tampar o rotor.
- Fechar a tampa da microcentrífuga. Selecionar a FCR e o tempo de centrifugação. Acionar o rotor.
- Esperar a parada completa da microcentrífuga para abrir a tampa e retirar os microtubos.
- Fechar a tampa da microcentrífuga e desligá-la. Se for refrigerada, deixar a tampa aberta até que ocorra o derretimento do gelo e a evaporação da água acumulada na câmara interna.

Monitoramento

- Pelo menos uma vez ao ano ou após qualquer serviço de manutenção, enviar para assistência técnica credenciada, para ser feita a aferição da rotação, do temporizador, do termômetro e do tacômetro (se houver).

11.2.8 Coagulador de meio de cultura

Utilizado na preparação de meios de cultura à base de ovo, deve alcançar e manter um calor úmido constante de 80-85°C por 45 minutos. As prateleiras para acomodação dos tubos devem permitir a livre circulação de calor, bem como a inclinação dos tubos no ângulo correto (entre 5° e 10°).

Conduta

- Instalar o coagulador em local próximo à rede hidráulica e de esgoto, que servirá para o abastecimento da caldeira de vapor e drenagem da mesma, respectivamente.
- Acertar a inclinação correta das prateleiras ou racks com auxílio de um tubo de cultura contendo água no mesmo volume de meio de cultivo, antes de ligar o coagulador.

- Retirar todas as prateleiras ou racks onde serão acomodados os tubos antes de ligar o equipamento.

Uso

- Certificar que todos os interruptores do coagulador estejam desligados.
- Verificar o nível de água da caldeira de vapor. Se necessário acrescente água até o nível de trabalho.
- Ligar o interruptor “Geral” do equipamento. Os mostradores de “Temperatura” e “Set Point” entrarão em funcionamento.
- Ligar o interruptor “Circulação de Ar”. Se o mesmo estiver desligado não haverá aquecimento.
- Ligar o interruptor “Temperatura Interna”.
- Ligar o interruptor “Temperatura Vapor”.
- Aguarde a estabilização das temperaturas para colocação das prateleiras ou racks contendo os tubos com meio de cultura já distribuído.

Monitoramento

- Buscar a presença de vazamentos tanto na alimentação de água quanto na drenagem da caldeira de vapor.
- Verificar a estabilidade das temperaturas interna e do vapor. Solicitar assistência técnica credenciada para aferição dos termostatos e seus sensores sempre que necessário ou anualmente.
- Realizar o Controle de Qualidade Interno e Externo dos meios produzidos conforme descrito no capítulo 7.

11.2.9 Cuba e fonte de eletroforese

A cuba e a fonte de eletroforese são utilizadas para a separação eletroforética de ácidos nucléicos em um gel de agarose submerso. Por questões de segurança, a indicada é aquela em que a conexão dos fios da fonte a cuba de eletroforese só é possível se a mesma estiver com a tampa fechada. Dessa forma, quando a fonte estiver ligada, o operador não corre o risco de entrar em contato com o tampão de corrida da cuba e sofrer um choque elétrico. Os conectores da cuba devem ser compatíveis com a fonte e vice-versa, porém, caso não sejam, podem ser utilizados adaptadores para os diferentes conectores. Por serem utilizadas de forma acoplada, as condutas, uso e monitoramento são descritos conjuntamente.

Condutas

- Utilizar uma tomada aterrada para cada equipamento.

- Instalar e sempre manter a cuba e a fonte de eletroforese em área de pós-PCR para evitar a dispersão de produtos amplificados.
- Lavar todos os componentes da cuba com detergente neutro e uma esponja (de espuma) antes de iniciar e ao término da eletroforese. Enxaguar com Água destilada e deixar secar a temperatura ambiente. Nunca usar esponja de aço, acetona, ésteres, álcool (acima de 30%) ou ácidos (acima de 25%) para limpeza da cuba, para não riscar ou tornar o acrílico opaco. Nunca autoclavar ou aquecer acima de 50°C qualquer componente da cuba.
- Ajustar o nivelamento da cuba.

Uso

- Posicionar a bandeja com a agarose solidificada na cuba de eletroforese. O volume de gel de agarose e a concentração são dependentes da metodologia utilizada. Aplicar as amostras.
- Fechar a tampa da cuba, conectar os fios da mesma à fonte de eletroforese e programar os parâmetros da corrida eletroforética.
- Certificar se as conexões dos pólos entre a cuba e a fonte de eletroforese estão corretas antes de ligar a fonte. A inversão dos pólos fará com que as amostras aplicadas migrem para o pólo incorreto.
- Ligar o interruptor geral da fonte da eletroforese. Ligar o interruptor da corrida eletroforética e observar nos minutos iniciais da eletroforese se a migração das amostras de ADN está na direção do pólo correto.
- Deixar ocorrer a migração das amostras, conforme tempo previsto na técnica.
- Desligar o interruptor da eletroforese após tempo previsto. Desligar o interruptor geral da fonte e desconectar os fios entre a fonte e a cuba. Abrir a tampa e retirar o suporte com a agarose.

Monitoramento

- Procurar a presença de fissuras no acrílico, incrustações nos plugues (eletrodos) ou rompimento do fio de platina antes de cada uso ou se a eletroforese não proceder de modo esperado.
- Encaminhar a cuba e/ou a fonte de eletroforese para assistência técnica se esta necessitar de substituições de componentes como plugues, fios de platina ou de contenção de vazamentos.

11.2.10 Destilador de água

No destilador, a água sofre uma ebulição, vaporização e condensação que, teoricamente, torna-a isenta de qualquer impureza. O equipamento deve possuir desligamento automático na falta de fornecimento de água.

Conduatas

- Instalar o destilador em local próximo à rede hidráulica e elétrica.
- Mensalmente ou sempre que houver depósitos ou incrustações, lavar com esponja de aço, água e sabão neutro o recipiente de evaporação e a resistência. Enxaguar com bastante água para retirar o resíduo de sabão.

Uso

- Confirmar se há fornecimento de água e ligar a torneira que abastece de água o destilador.
- Aguardar a saída de água pelo dreno de resfriamento do condensador.
- Ligar a chave elétrica geral do equipamento e aguardar a saída da água destilada pelo respectivo dreno.
- Acondicionar a Água destilada em recipiente apropriado.
- Desligar a chave elétrica geral do destilador ao término do processo.
- Deixar a torneira que abastece o destilador aberta até o resfriamento do condensador.
- Desligar o fornecimento de água.

Monitoramento

- A cada uso, verificar a presença de obstrução ou vazamentos no circuito de abastecimento de água.
- Verificar sempre as condições das instalações elétricas.

11.2.11 Estufas bacteriológicas

É aconselhável que tenha o maior tamanho possível já que os modelos pequenos sofrem maior variação de temperatura quando a porta é aberta. Quando a temperatura de incubação é menor que a temperatura ambiente, por exemplo, na incubação de provas bioquímicas, deve ser utilizada uma estufa bacteriológica com sistema refrigerado incluso².

Conduta

- Evitar sobrecarregar o interior da estufa para assegurar a circulação de ar e a manutenção da temperatura interna.
- Abrir a porta somente o necessário.
- Instalar as estufas em locais bem ventilados, distantes de fonte de calor e de água.

Uso

- Organizar todo material a ser incubado para abrir a estufa uma única vez.

- Distribuir os materiais nos diversos compartimentos e fechar corretamente a porta.
- Verificar se a porta ficou devidamente fechada.
- Realizar os mesmos passos ao retirar o material incubado.

Monitoramento¹

- Deve ser realizado diariamente, ao início da rotina do laboratório, com duas leituras de temperatura: uma utilizando um termômetro de leitura pontual e outra com o termômetro de máxima e mínima.
- Realizar outra leitura no horário de maior uso do equipamento, com termômetro de leitura pontual.
- Registrar os dados de cada leitura no Formulário de Monitoramento – Estufa Bacteriológica. O Formulário de Monitoramento – Estufa Bacteriológica é apresentado no item 11.4.4 nos anexos deste Capítulo.

11.2.12 Freezer e refrigerador

O *freezer* vertical proporciona um melhor aproveitamento do espaço do laboratório do que o horizontal e a sua temperatura ideal é de -20°C. A temperatura ideal de uso do refrigerador é de 4°C, com variação aceitável de 2 a 8°C.

ATENÇÃO: Os equipamentos que não formam gelo (*frost free*) provocam evaporação excessiva de líquidos em frascos não fechados hermeticamente.

Condução

- Instalar o refrigerador e *freezer* em locais bem ventilados ou distantes de fonte de calor, deixando a distância mínima de 10 cm entre cada equipamento ou da parede.

Uso

- Evitar o acondicionamento de excesso de material e não forrar as prateleiras para não interferir na refrigeração interna¹.
- Organizar todo material a ser armazenado para abrir a porta uma única vez.

Monitoramento

- Fazer uma verificação periódica das borrachas de vedação.
- Descongelar mensalmente. Inicialmente transferir todo conteúdo para outra geladeira ou *freezer*. Desligar e após o degelo desinfetar internamente com um pano umedecido com Solução de Álcool a 70% e depois com água e detergente

neutro. A preparação e o Formulário de Controle da Preparação da Solução de Álcool à 70% estão descritos no Capítulo 3.

- Realizar diariamente controle de temperatura¹ sendo.
 - Ao início da rotina do laboratório, com duas leituras de temperatura: uma utilizando um termômetro de leitura pontual (bulbo de mercúrio, álcool ou eletrônico) e outra com o termômetro de máxima e mínima, exclusivo para cada equipamento.
 - No horário de maior uso do equipamento com termômetro de leitura pontual.
 - Registrar os dados de cada leitura no Formulário de Monitoramento – Refrigerador e Freezer. O Formulário de Monitoramento – Refrigerador e Freezer é apresentado no item 11.4.5 nos anexos deste Capítulo.

ATENÇÃO: No uso de termômetro eletrônico, o mostrador deve ser fixado externamente, já que a simples abertura da porta pode alterar a leitura da temperatura.

11.2.13 Medidor de pH

Equipamento utilizado para determinação de pH, através do método eletromagnético, com compensação automática de temperatura.

Conduta

- Antes de ligar, verificar se o equipamento e a rede elétrica estão na mesma voltagem.
- Ao término de cada medição ou calibração manter a chave seletora em (*Standby*), repouso.

Uso

- Para ligar o aparelho acionar a chave geral liga-desliga.
- Manter o aparelho ligado por, no mínimo, 30 minutos, para aquecer e estabilizar os componentes eletrônicos.
- Conectar bem o eletrodo e o sensor de temperatura ao aparelho.
- Lavar bem o eletrodo com Água destilada, secar com papel absorvente macio sem esfregar a membrana.
- Mergulhar o eletrodo e o sensor de temperatura na solução tampão de valor pH 6.86 à 25°C e ajustar com o potenciômetro “*Potenciômetro de ajuste do tampão pH 7 e do potencial mV relativo – Calibração*”. Medir a temperatura da solução, ver na tabela pH/t inscrita no frasco da solução tampão que acompanha o aparelho e ajustar o valor exato do pH de acordo com a temperatura.

- Retirar o eletrodo e o sensor afixados no suporte da solução. Enxaguar ambos com Água destilada, secar com papel absorvente e macio.
- Para medir na faixa ácida, mergulhar o eletrodo e o sensor de temperatura na solução tampão pH 4.01, ajustar com o potenciômetro “*Potenciômetro de ajuste do (SLOPE), declive, ou do tampão diferente de pH 7*”, para exatamente o valor da solução tampão de acordo com a temperatura da solução, da mesma forma de como foi descrito para ajustar tampão pH 7. Para as medições de rotina na faixa alcalina realizar o mesmo procedimento, porém, com a solução tampão de valor pH 9,18 ou pH 10,01.
- Ao terminar esses procedimentos o pHmetro está calibrado e pronto para ser usado nas medições de rotina.
- Retirar o eletrodo e o sensor da última solução tampão usada. Lavar com Água destilada, secar com papel absorvente macio para não arranhar a membrana de vidro gelatinoso, antes de introduzi-los na amostra a ser medida.
- Mergulhar o eletrodo e o sensor na amostra. O valor que aparecer no visor é o pH da amostra.
- Para desligar, lavar o eletrodo com Água destilada e seguir as instruções para manutenção e conservação dos eletrodos descritas abaixo.
- Desligar a chave geral liga-desliga e a tomada do sensor de temperatura.

Monitoramento

- Depois de usar o eletrodo, lavar e colocar a proteção da membrana com solução de repouso (solução de KCl 3M), para manter este úmido.
- Quando o eletrodo de referência não estiver em uso, deve ficar imerso na solução de repouso.
- Caso o eletrodo secar ou ficar parado por um longo período, deixar imerso em solução repouso por 6 horas.
- A umidade e agentes corrosivos danificam o aparelho, caso o pHmetro apresentar leituras instáveis, limpar o (*Plug*), conector, do eletrodo e a tomada do aparelho, com álcool etílico ou acetona.

ATENÇÃO: Quando o pH da Água destilada for medido e o aparelho indicar o valor na faixa ácida e essa leitura ficar instável para fazer esse tipo de medição, é necessário utilizar um par combinado de eletrodo especial que tenha a junção tipo “luva” e deverão ser adicionadas, na água, algumas gotas de KCl para aumentar a condutividade. Aguardar 24 horas para fazer a medição.

Preparação da solução KCl 3M: pesar 223,68g de KCl, dissolver em 1 litro de Água destilada e deionizada. Armazenar em frasco de polietileno de 2 a 8°C. Estabilidade: 6 meses.

11.2.14 Micropipetadores

São instrumentos utilizados para medir e transferir líquidos em microvolumes utilizando conjuntamente “ponteiros”. As micropipetas podem ser de volume fixo ou variável, monocal ou multicanal dependendo da metodologia a ser empregada.

Conduta¹

- Utilizar preferencialmente ponteiros com barreira ou filtro anti-aerossol.
- Evitar a reutilização de ponteiros, já que os procedimentos de lavagem não garantem a remoção completa dos resíduos.
- Manter as micropipetas sempre na posição vertical.
- Limpar externamente a micropipeta com Solução de Álcool a 70%, antes e após o uso. A preparação e o Formulário de Controle da Preparação da Solução de Álcool a 70% estão descritos no Capítulo 3.

Uso

- Selecionar a micropipeta e o volume de acordo com as soluções a serem pipetadas.
- Acoplar a ponteira à micropipeta.
- Pressionar o êmbolo da micropipeta até o primeiro estágio.
- Introduzir a ponteira abaixo da superfície do líquido, aproximadamente 5 mm.
- Soltar o êmbolo gradativamente, aspirando ao líquido.
- Dispensar o líquido, pressionando o êmbolo até o segundo estágio.
- Soltar o êmbolo lentamente até a sua posição original.
- Descartar as ponteiros em recipiente contendo hipoclorito de sódio 2% ou em saco plástico autoclavável.

Monitoramento

- Verificar a presença de algum componente quebrado, dificuldade no acionamento do êmbolo ou vazamento no sistema.
- Realizar o teste hidrostático¹ para detectar vazamento no sistema. Proceder conforme descrito a seguir:
 - fixar a ponteira na micropipeta.
 - aspirar Água destilada até o primeiro estágio.
 - tampar a extremidade inferior da ponteira com um dedo.
 - pressionar o êmbolo até o segundo estágio, permanecendo assim por 20 segundos em micropipetas de até 1 ml. Para micropipetas de mais de 1 ml:

pressionar o êmbolo até o ponto médio entre os dois estágios da micropipeta.

- liberar o êmbolo lentamente até a posição original.
- retirar o dedo da extremidade da ponteira e verificar se há deslocamento da água. Se houver, a micropipeta deve ser encaminhada para manutenção e ajuste.
- os micropipetadores devem fazer parte do programa de manutenção preventiva sistemática do laboratório e sua precisão deve ser verificada periodicamente pelo método gravimétrico.

11.2.15 Microscópio

O microscópio deve ser binocular, possuir um bom conjunto óptico, ser ergonômico e possuir objetiva de imersão planocromática.

Condução

- Instalar longe de equipamentos que causem vibrações, de reagentes químicos ou da rede hidráulica, em sala limpa, bem ventilada ou que tenha ar-condicionado para evitar a proliferação de fungos no sistema óptico^{1, 4}.
- Evitar que o microscópio fique sem as objetivas ou oculares para impedir a entrada de poeira.
- Coibir a desmontagem do microscópio para não desalinhar o conjunto óptico.
- Carregar sempre com as duas mãos, uma segurando firmemente o braço do microscópio e a outra a base⁴.

Uso

- Impedir o uso de papel-toalha comum ou gaze para evitar riscos nas lentes. Nunca use detergente, xilol, etanol 96% ou outro solvente para limpeza das lentes. Esses produtos podem retirar a cola que fixa as lentes aos corpos das objetivas e oculares¹.
- Verificar os procedimentos de uso do microscópio no Capítulo 6, deste manual.

Monitoramento

- Efetuar mensalmente a limpeza geral do microscópio¹, executando os seguintes passos.
 - Retirar a poeira agregada aos mecanismos de movimentação da platina, do condensador e do ajuste de foco com um pincel de cerdas macias.
 - Realizar a limpeza geral com um pano limpo umedecido com Solução de Álcool a 70%, com exceção do conjunto óptico (objetivas e oculares). A

preparação e o Formulário de Controle da Preparação da Solução de Álcool a 70% estão descritos no Capítulo 3.

- Executar a limpeza das objetivas e oculares com papel absorvente macio umedecido em uma solução contendo 60% de etanol e 40% de éter etílico. A limpeza da objetiva de imersão deverá ser feita com um papel absorvente macio para retirada do excesso de óleo, seguida da aplicação da solução de álcool-éter.

11.2.16 Termociclador

O termociclador é utilizado nas técnicas moleculares para amplificar ácidos nucleicos. Existem diversos modelos que podem ser escolhidos de acordo com a rotina do laboratório de biologia molecular e da metodologia a ser utilizada, sendo que cada modelo apresenta sua particularidade de uso e monitoramento que devem ser consultados nos respectivos manuais. De modo geral, as condutas, uso e monitoramento são a seguir apresentados.

Condutas

- Instalar os termocicladores em sala isolada ou distante das áreas de pré-PCR e pós-PCR.
- Utilizar uma tomada aterrada e, se possível, conectar o termociclador a um *nobreak*.
- Evitar o funcionamento durante o período noturno sempre que possível para incrementar a vida útil do equipamento, especialmente em regiões onde ocorre interrupção no fornecimento de energia elétrica.

Uso

- Ligar o termociclador.
- Inserir o programa de PCR a ser utilizado. Caso já esteja inserido, selecioná-lo dentre os programas armazenados.
- Colocar os microtubos no bloco de amostras.
- Fechar a tampa do equipamento.
- Iniciar o programa escolhido.
- Verificar periodicamente o andamento do programa.

Monitoramento

- Limpar o bloco de amostras e a tampa do termociclador pelo menos uma vez por mês ou sempre que necessário. Usar uma haste de algodão ou *swab* embebida com álcool isopropílico.

- Realizar mensalmente o “auto teste” ou teste de desempenho do sistema, para verificar a necessidade ou não de encaminhar o equipamento para manutenção.
- Encaminhar anualmente para a assistência técnica credenciada para realizar a manutenção geral do equipamento.

11.2.17 Termômetros

Nos laboratórios, os termômetros são instrumentos imprescindíveis para o controle da temperatura em vários ensaios, na conservação de substâncias e microrganismos, no próprio ambiente de trabalho e no monitoramento de alguns equipamentos. Os mais utilizados são os termômetros de máxima e mínima e os de leitura pontual ou instantânea¹.

Os termômetros de leitura pontual ou instantânea são usados para medir a temperatura em um momento ou para o monitoramento de equipamentos. Eles podem ser de bulbo (mercúrio ou álcool) ou eletrônico e possuem as resoluções padrões de 0,5°C e 0,1°C, respectivamente¹.

Os termômetros de máxima e mínima mostram as temperaturas extremas ocorridas durante um determinado período. Possuem duas colunas de mercúrio, sendo uma para indicar a temperatura mínima e outra para a máxima. São utilizados para o monitoramento de equipamentos como *freezer*, geladeiras e estufas, além do controle da temperatura ambiente do laboratório. Eles acusam se houve a interrupção temporária de fornecimento de energia elétrica ou o mau funcionamento de um equipamento¹.

Condutas

- Guardar o termômetro em sua embalagem original para evitar a quebra do bulbo, quando não estiver em uso. No termômetro eletrônico, retirar a bateria do seu compartimento e ter sempre uma sobressalente.
- Evitar a utilização de termômetros com descontinuidades na coluna de mercúrio ou de álcool.
- Posicionar os termômetros de modo que os bulbos ou sensores fiquem localizados medianamente no espaço interno do equipamento. Não posicioná-los muito próximos às resistências de estufa, banho-maria ou da ventilação interna da geladeira e do *freezer*, sob o risco de realizar uma leitura equivocada.

Uso do termômetro de leitura pontual

- Colocar os bulbos ou sensores dos termômetros de leitura pontual em um frasco contendo uma solução de glicerol a 10% em água, para manter a temperatura estável¹. Lacrar o frasco e acondicioná-lo no compartimento interno do equipa-

mento a ser controlado. Aguardar pelo menos um pernoite para realizar a primeira leitura.

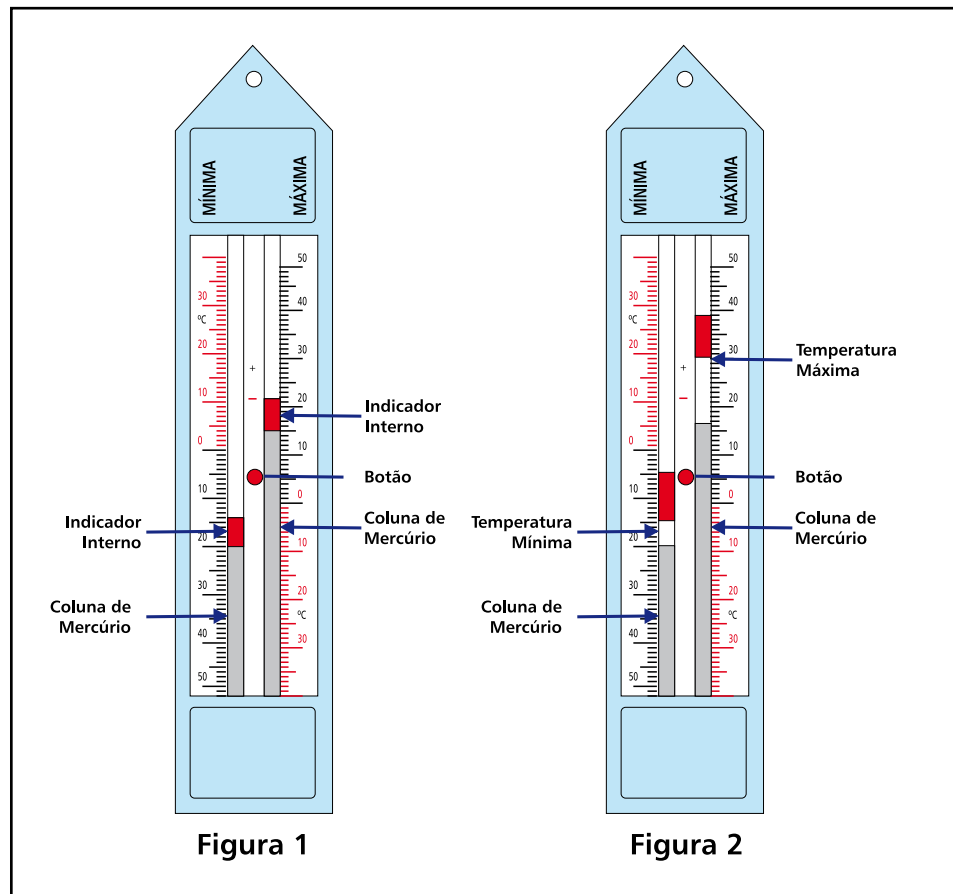
- Leitura
 - Termômetro de bulbo: abrir a porta do equipamento e, imediatamente, verificar a temperatura pontual sem retirar o termômetro do interior do equipamento, anotando-a no respectivo mapa de controle.
 - Termômetro eletrônico: ler a temperatura indicada no mostrador externo e anotá-la no respectivo mapa de controle.

Uso do termômetro de máxima e mínima

- Posicionar os indicadores internos (barras de metal) nos limites das colunas de mercúrio acionando o botão específico ou com auxílio de um ímã apropriado, (conforme o modelo de termômetro) (veja Figura 1).
- Colocar o termômetro no compartimento interno do equipamento a ser controlado. Aguardar pelo menos um pernoite para realizar a primeira leitura.
- Abrir a porta do equipamento e, imediatamente, verificar as temperaturas máxima e mínima, anotando-as no respectivo mapa de controle (veja Figura 2).
- Posicionar novamente os indicadores internos junto à coluna de mercúrio, de acordo com a instrução anterior e recolocar o termômetro no interior do equipamento.

Monitoramento

- Averiguar a presença de descontinuidades na coluna de mercúrio ou de álcool dos termômetros.
- Verificar se os termômetros utilizados no laboratório exibem a mesma leitura de um termômetro de referência certificado e validado pelo Inmetro.



Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TEELAB, 1998, 76 p.

11.3 Referências

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TELELAB, 1998, 76 p.
2. COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. *Tuberculosis bacteriology – Organization and Practice*. Butterworth-Heinemann, 139p, 1997.
3. WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture*. Geneva, 96p, 1998.
4. WHO/World Health Organization. *Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy*. Geneva, 62p, 1998.
5. SELVAKUMAR, N.; GOVINDAN, D.; CHANDU, N.A.; FRIEDEN, T.R.; NARAYANAN, P.R. Processing sputum specimens in a refrigerated centrifuge does not increase the rate of isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:469-471, 2003.

11.4 Anexos do capítulo

11.4.1 Formulário de Monitoramento – Banho-maria



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Monitoramento – Banho-maria

Marca:	Modelo:			
Nº Patrimônio:	Sala:			
Mês:	Ano:			

Dia	Temperatura	Depósitos e Contaminações	Nível de Água	Intervenção
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				

Depósitos e Contaminações: S – Sim N – Não Nível de água: 1 – Adequado 2 – Baixo	Intervenções: 1 – Limpeza 2 – Manutenção 3 – Acréscimo de água 4 – Ajuste do termostato 5 – Outros (Indicar)
Irregularidades/Ocorrências:	
Ações corretivas ou preventivas:	

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TELELAB, 1998, 76 p.

11.4.2 Formulário de Registro de Uso – Cabine de Segurança Biológica (CSB)



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Registro de Uso – Cabine de Segurança Biológica (CSB)

Marca:	Modelo:
Nº Patrimônio:	Sala:
Mês:	Ano:

Dia	Hora Inicial de uso	Pré-uso Lâmpada UV (20-30 minutos)	Pós-uso Lâmpada UV (20-30 minutos)	Hora Final de uso	Usuário
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					

Irregularidades/Ocorrências:		
Ações corretivas ou preventivas:		
Desinfecção Mensal:	Data: ____/____/____	Técnico:

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TELEXLAB, 1998, 76 p.

11.4.3 Formulário de Registro de Uso – Cabine Exaustão (CE)



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Registro de Uso – Cabine Exaustão (CE)

Marca:	Modelo:				
Nº Patrimônio:	Sala:				
Mês:	Ano:				

Dia	Hora Inicial de uso	Substância química manipulada	Hora Final de uso	Usuário	Observação
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					

Irregularidades/Ocorrências:		
Ações corretivas ou preventivas:		
Desinfecção Mensal:	Data: ____/____/____	Técnico:

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TELELAB, 1998, 76 p.

11.4.4 Formulário de Monitoramento – Estufa Bacteriológica



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Monitoramento – Estufa Bacteriológica

Marca:				Modelo:			
Nº Patrimônio:				Sala:			
Mês:				Ano:			

Dia	Primeira Leitura ^A				Segunda Leitura ^B		Observações
	Temperatura Mínima	Temperatura Máxima	Temperatura Pontual	Hora	Temperatura Pontual	Hora	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							

A – Hora de início da rotina B – Hora de maior uso do equipamento

Irregularidades/Ocorrências:

Ações corretivas ou preventivas:

Desinfecção Mensal: Data: ____/____/____ Técnico: _____

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TELELAB, 1998, 76 p.

11.4.5 Formulário de Monitoramento – Refrigerador e Freezer



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde

Formulário de Monitoramento – Refrigerador e Freezer

Marca:				Modelo:			
Nº Patrimônio:				Sala:			
Mês:				Ano:			

Dia	Primeira Leitura ^A				Segunda Leitura ^B		Observações
	Temperatura Mínima	Temperatura Máxima	Temperatura Pontual	Hora	Temperatura Pontual	Hora	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							

A – Hora de início da rotina

B – Hora de maior uso do equipamento

Irregularidades/Ocorrências:

Ações corretivas ou preventivas:

Desinfecção Mensal: _____ Data: ____/____/____ Técnico: _____

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Equipamentos – Utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Série TELELAB, 1998, 76 p.

ISBN 978-85-334-1447-1



disque saúde:
0800 61 1997

www.saude.gov.br/svs
www.saude.gov.br/bvs

Apoio



Realização

Secretaria de
Vigilância em Saúde

Ministério
da Saúde

