

Recomendações da
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE PATOLOGIA CLÍNICA/
MEDICINA LABORATORIAL
(SBPC/ML):

*Boas Práticas em
Microbiologia Clínica*

Recomendações da

SOCIEDADE BRASILEIRA
DE PATOLOGIA CLÍNICA/
MEDICINA LABORATORIAL

(SBPC/ML):

*Boas Práticas em
Microbiologia Clínica*

Recomendações da
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE PATOLOGIA CLÍNICA/
MEDICINA LABORATORIAL
(SBPC/ML):

*Boas Práticas em
Microbiologia Clínica*



SBPC/ML

ISO 9001

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA
CLÍNICA / MEDICINA LABORATORIAL



Manole

Copyright © 2015 Editora Manole Ltda., por meio de contrato de coedição com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial – SBPC/ML.

Minha editora é um selo editorial Manole

Logotipos: *Copyright* © Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, BD, bioMérieux, Plast Labor, Probac do Brasil, Roche Diagnóstica Brasil Ltda.

Editor gestor: Walter Luiz Coutinho

Editora: Karin Gutz Inglês

Produção Editorial: Cristiana Gonzaga S. Corrêa, Juliana Morais e Lia Fugita

Capa e projeto gráfico: Daniel Justi

Diagramação: Sopros Design

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (47. : 2014 : São Paulo)

Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) :

boas práticas em microbiologia clínica. -- Barueri, SP : Manole : Minha Editora, 2015.

ISBN 978-85-7868-192-0

1. Diagnóstico de laboratório 2. Laboratórios médicos 3. Patologia clínica I. Título.

14-07647

CDD-616.01078

NLM-QY 25

Índices para catálogo sistemático:

1. Microbiologia clínica : Patologia clínica :

Medicina laboratorial 616.01078

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte deste livro poderá ser reproduzida, por qualquer processo, sem a permissão expressa dos editores.

É proibida a reprodução por xerox.

A Editora Manole é filiada à ABDR – Associação Brasileira de Direitos Reprográficos.

1ª edição – 2015

Editora Manole Ltda.

Avenida Ceci, 672 – Tamboré

06460-120 – Barueri – SP – Brasil

Tel.: (11) 4196-6000 – Fax: (11) 4196-6021

www.manole.com.br | info@manole.com.br

Impresso no Brasil | Printed in Brazil

Este livro contempla as regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, que entrou em vigor no Brasil em 2009.

São de responsabilidade dos organizadores e dos autores as informações contidas nesta obra.

ORGANIZADORES

Ismar Barbosa

Adagmar Andriolo

Carlos Alberto Franco Ballarati

César Alex de Oliveira Galoro

Luisane Maria Falci Vieira

Wilson Shcolnik

Nairo Massakazu Sumita

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/
MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML)
DIRETORIA EXECUTIVA – BIÊNIO 2014/2015**

Presidente: Paula Fernandes Távora

Vice-presidente: César Alex de Oliveira Galoro

Diretora Administrativa: Lucia Helena Cavalheiro Villela

Vice-diretor Administrativo: Paulo Sérgio Roffé Azevedo

Diretor Científico: Nairo Massakazu Sumita

Vice-diretora Científica: Luisane Maria Falci Vieira

Diretor de Comunicação: Gustavo Aguiar Campana

Diretora Financeira: Leila Carmo Sampaio Rodrigues

Vice-diretora Financeira: Claudia Maria Meira Dias

Diretor de Acreditação e Qualidade: Wilson Shcolnik

Diretor de Eventos: Armando Alves da Fonseca

Vice-diretor de Eventos: Carlos Alberto Franco Ballarati

Diretor de Defesa de Profissional: Vitor Mercadante Pariz

Presidente do Conselho de Ex-presidentes: Paulo Sérgio Roffé Azevedo

ORGANIZADORES

Ismar Barbosa

Médico Patologista Clínico. Pós-graduação em Gestão Empresarial pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). Diretor Médico da Empresa Qualilab Serviços Médicos. Diretor da Empresa Quality & Research – Qualidade e Pesquisa.

Adagmar Andriolo

Médico Patologista Clínico. Professor-associado do Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Assessor Médico de Formato Clínico – Projetos em Medicina Diagnóstica. Editor-chefe do *Jornal Brasileiro de Patologia/Medicina Laboratorial*.

Carlos Alberto Franco Ballarati

Médico Patologista Clínico. Doutor em Patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). MBA em Gestão de Saúde pelo Instituto de Ensino e Pesquisa (Insper)/Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Ex-presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – Biênio 2010-2011. Vice-diretor de Eventos da SBPC/ML – Biênio 2014-2015.

César Alex de Oliveira Galoro

Doutor em Medicina pela FMUSP. MBA em Gestão da Saúde pela FGV-SP. Médico Patologista Clínico do Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas (LPC/Unicamp) e do Laboratório Franceschi. Vice-presidente da SBPC/ML – Biênio 2014-2015.

Luisane Maria Falci Vieira

Médica Patologista Clínica. Diretora Técnica do Laboratório Médico Geraldo Lustosa. Médica do Laboratório do Hospital Governador Israel Pinheiro. Vice-diretora Científica da SBPC/ML – Biênio 2014-2015.

Wilson Shcolnik

Médico Patologista Clínico. Mestre em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP/Fiocruz) – Subárea de Planejamento e Gestão. MBA em Gestão pela Qualidade Total pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Gerente Corporativo de Relações Institucionais do Grupo Fleury. Presidente da SBPC/ML – Biênio 2006-2007. Diretor de Acreditação e Qualidade da SBPC/ML – Biênio 2014-2015.

Nairo Massakazu Sumita

Médico Patologista Clínico. Professor-assistente Doutor da Disciplina Patologia Clínica da FMUSP. Diretor do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP – LIM 03 da Patologia Clínica. Assessor Médico em Bioquímica Clínica do Fleury Medicina e Saúde. Consultor Científico do Latin American Preanalytical Scientific Committee (LASC). Membro do Editorial Board do site specimencare.com. Diretor Científico da SBPC/ML – Biênio 2014-2015.

AUTORES

Angela Von Nowakowski

Médica Patologista Clínica. Residência Médica em Patologia Clínica pelo HCFMUSP e em Microbiologia Clínica pela Universidade de Toronto, Canadá. Mestre em Patologia Clínica pela Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp.

Antonia Maria de Oliveira Machado

Médica Patologista Clínica. Mestre e Doutora em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da EPM-Unifesp. Professora-afiliada da Disciplina Medicina Laboratorial do Departamento de Medicina da EPM-Unifesp. Diretora do Laboratório Central do Hospital São Paulo/Unifesp.

Carla Albuquerque de Oliveira

Engenheira Química. Pós-graduada em Engenharia de Produção pela Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto nacional de Tecnologia (UFRJ/INT), em Gestão de Serviços – Sênior Service MBA do Ibmecc/RJ e MBA Marketing da Coppead. Assessora da ControlLab em Qualidade e Controle de Qualidade. Membro do Grupo Assessor da ControlLab para Indicadores Laboratoriais. Consultora em Qualidade e Produtividade.

Carmen Paz Oplustil

Biomédica. Mestre em Microbiologia. Diretora da Formato Clínico.

Cassia Maria Zoccoli

Farmacêutica Bioquímica. Diretora Técnica do Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis, SC.

Cassiana da Costa Ferreira Leite

Bióloga. Mestre em Microbiologia Clínica pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM-UERJ). MBA em Saúde pela FGV-RJ. Doutoranda em Microbiologia Clínica pela FCM-UERJ.

Elizabeth de Andrade Marques

Biomédica. Doutora em Microbiologia. Professora-associada de Microbiologia da UERJ.

Igor Mimica

Médico. Consultor da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP).

Ismar Barbosa

Médico Patologista Clínico. Pós-graduação em Gestão Empresarial pela FGV. Diretor Médico da Empresa Qualilab Serviços Médicos. Diretor da Empresa Quality & Research – Qualidade e Pesquisa.

João Nóbrega Almeida Junior

Médico Infectologista. Doutor em Ciências pela FMUSP. Médico-assistente do Serviço de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP.

Jorge Luiz Mello Sampaio

Médico Patologista Clínico. Professor de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Médico Responsável pelo Setor de Microbiologia do Fleury Medicina e Saúde.

Kátia Regina Netto dos Santos

Biomédica. Professora-associada do Instituto de Microbiologia da UFRJ. Pesquisadora Nível 1 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Cientista do Nosso Estado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Lycia Mimica

Médica. Professora Adjunta de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP).

Maria Elizabete Mendes

Médica Patologista Clínica. Doutora em Medicina-Patologia pela FMUSP. Administradora Hospitalar e de Sistema de Saúde pela Escola de Administração de Empresas de São Paulo (EAESP-FGV). Responsável pelo Núcleo da Qualidade e Sustentabilidade da DLC/HCFMUSP. Chefe de Seção Técnica de Bioquímica de Sangue da DLC/HCFMUSP.

Maria Gabriela de Lucca Oliveira

Médica Patologista Clínica. Diretora do Laboratório Central do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FUNFARME/FAMERP).

Maria Goreth Matos de Andrade Barberino

Farmacêutica Bioquímica. Especialista em Análises Clínicas pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Doutora e Mestre em Ciências pela Fiocruz. Chefe do Serviço de Microbiologia – HUPES – UFBA. Consultora do Serviço de Microbiologia do Hospital São Rafael, Salvador – BA.

Marinês Dalla Valle Martino

Médica Patologista Clínica. Professora Adjunta da Disciplina Microbiologia da FCMSCSP. Coordenadora Médica do Setor de Microbiologia do Laboratório Clínico do HIAE.

Nairo Massakazu Sumita

Médico Patologista Clínico. Professor-assistente Doutor da Disciplina de Patologia Clínica da FMUSP. Diretor do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP – LIM 03 da Patologia Clínica. Assessor Médico em Bioquímica Clínica do Fleury Medicina e Saúde. Consultor Científico do Latin American Preanalytical Scientific Committee (LASC). Membro do Editorial Board do site “specimencare.com”. Diretor Científico da SBPC/ML – Biênio 2014-2015.

Pedro Fernandez Del Peloso

Biólogo. Microbiologista Clínico. Mestre em Saúde e Medicina Laboratorial pela UERJ. Gerente de Microbiologia e Biologia Molecular do Laboratório Richet – RJ.

Robson de Souza Leão

Biólogo. Doutor em Microbiologia Médica Humana. Mestre em Microbiologia – Bacteriologia Clínica pela UERJ. Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ.

Thais Romano Sabato Romano Di Gioia

Médica Patologista Clínica. Especialista em Microbiologia Clínica e Clínica Médica. Médica-assistente no Laboratório de Microbiologia da Divisão Laboratório Central do HCFMUSP. Médica-assistente da Microbiologia do Laboratório Diagnósticos da América (DASA).

Sumário

| | |
|--|-----|
| Prefácio | XV |
| 1. Área física do laboratório de microbiologia e legislação vigente | 1 |
| 2. Biossegurança | 21 |
| 3. Rotinas em microbiologia | 39 |
| 3.1. Urocultura | 39 |
| 3.2. Hemocultura | 53 |
| 3.3. Cultura de líquidos cavitários | 61 |
| 3.4. Cultura de secreções e cateter | 71 |
| 3.5. Cultura de fungos | 87 |
| 3.6. Cultura para <i>Candida</i> | 97 |
| 3.7. Cultura de liquor | 105 |
| 3.8. Cultura para micobactérias | 109 |
| 4. Antibiograma | 123 |
| 5. Controle interno da qualidade | 131 |
| 6. Ensaio de proficiência: análise crítica e plano de ação. | 137 |
| 7. Biologia molecular no laboratório de microbiologia. | 153 |
| 8. Espectrometria de massa MALDI-TOF em laboratório de microbiologia clínica: parâmetros e conceitos pré e pós-analíticos úteis para a rotina | 159 |
| 9. Infecções bacterianas emergentes | 171 |
| 10. Automação em microbiologia | 179 |
| 11. Verificação e validação de procedimentos no laboratório de microbiologia clínica. | 205 |
| 12. Treinamento e desenvolvimento | 213 |
| 13. Gestão de equipamentos no laboratório de microbiologia | 229 |

| | |
|---|-----|
| 14. Indicadores de qualidade em microbiologia clínica | 255 |
| Índice remissivo | 263 |
| Miniatlás colorido | 271 |

Prefácio

A **SOCIEDADE BRASILEIRA** de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) mais uma vez tem a grande alegria de apresentar este projeto editorial, intitulado *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Boas Práticas em Microbiologia Clínica*, lançado durante o 48º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, na cidade do Rio de Janeiro, Centro de Convenções Sul América, de 9 a 12 de setembro de 2014.

A SBPC/ML cumpre novamente sua missão de difundir os conhecimentos das boas práticas no laboratório clínico e deixa aqui a sua colaboração no processo de educação e desenvolvimento dos profissionais atuantes no ambiente laboratorial, bem como nas instituições de ensino que vêm utilizando os diversos livros publicados pela SBPC/ML no processo de formação dos futuros profissionais.

Assim, estamos orgulhosos em auxiliar os laboratórios clínicos no processo de melhoria da qualidade do serviço prestado e, por consequência, na garantia da segurança do paciente.

Este livro não tem a pretensão de esgotar o tema proposto. Comentários, sugestões e críticas são muito bem-vindos e, certamente, serão incorporados nas futuras revisões.

Agradeço aos organizadores(as) e aos autores(as) pela dedicação e empenho no desenvolvimento de mais este documento de recomendações.

Não poderia deixar de registrar um especial agradecimento às empresas parceiras que tornaram realidade mais este magnífico projeto da SBPC/ML:

- BD
- bioMeri ux
- Roche Diagnóstica Brasil Ltda.
- Plast Labor
- Probac do Brasil

Deixo aqui um abra o a você, associado da SBPC/ML.

Boa leitura!

Paula Fernandes Távora

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – Biênio 2014/2015

1. Área física do laboratório de microbiologia e legislação vigente

INTRODUÇÃO

O gestor de um laboratório de microbiologia, como o de qualquer laboratório, tem como funções:

- Garantir a qualidade efetiva dos processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos.
- Tangibilizar a qualidade dos seus serviços para os clientes finais.
- Garantir custo-efetividade do sistema de qualidade do laboratório.
- Obter a conformidade legal junto aos órgãos reguladores.

Portanto, para a obtenção da conformidade legal, o gestor tem de atender aos requisitos que determinam as resoluções, normas, diretrizes e outros documentos de regulação para que o laboratório consiga a habilitação para seu funcionamento. Sendo o laboratório de microbiologia um serviço de saúde, está sujeito à regulamentação dessa área. Esses documentos geralmente estabelecem os requisitos gerais para qualquer tipo de laboratório, seja de nível nacional, estadual ou municipal, mas, dependendo do escopo do serviço, existem normatizações específicas.

DEFINIÇÕES IMPORTANTES

1. Resolução da Diretoria Colegiada, também conhecida como RDC:r, é um decreto. Uma ordem emanada de uma autoridade superior ou órgão, contendo as diretrizes e normas regulamentadoras. É o poder do Estado que, nos moldes da constituição de um país, possui a atribuição de governar o povo e

- administrar os interesses públicos, cumprindo fielmente as ordenações legais. Exemplo: Resolução – RDC/Anvisa n. 302, de 13 de outubro de 2005, que dispõe sobre regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos.
2. Portaria: documento de ato administrativo de qualquer autoridade pública que contém ordens, instruções acerca da aplicação de leis ou regulamentos, recomendações de caráter geral e normas sobre a execução de serviços, a fim de esclarecer ou informar sobre atos ou eventos realizados internamente em órgão público. Exemplos: Portaria n. 485, de 11 de novembro de 2005, que aprova a NR 32. Portaria n. 29, de 17 de dezembro de 2013, que aprova o manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças e dá outras providências.
 3. Norma regulamentadora (NR): regulamenta e fornece orientações sobre procedimentos obrigatórios relacionados à segurança e à medicina do trabalho. Exemplo: NR 32, que tem por finalidade estabelecer as diretrizes básicas para a implementação de medidas de proteção à segurança e à saúde dos trabalhadores dos serviços de saúde, bem como daqueles que exercem atividades de promoção e assistência à saúde em geral.
 4. Norma técnica: ou norma padrão, é um documento, normalmente produzido por um órgão oficial acreditado para tal, que estabelece regras, diretrizes ou características acerca de um material, produto, processo ou serviço. A obediência a uma norma técnica, como as normas ISO ou ABNT, quando não referendada por uma norma jurídica, não é obrigatória. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é o órgão responsável pela normalização técnica no Brasil.
 5. Nota técnica: procedimentos a serem adotados na realização dos critérios de indicação, inclusão e exclusão de produtos. Exemplo: Nota técnica n. 01/2013, medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes.
 6. Diretrizes: conjunto de instruções ou indicações para se tratar e levar a termo uma ação, um plano, um negócio, etc., definidas por meio de um consenso de profissionais com *expertise* no assunto.

ESCOPO DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Na tentativa de habilitar um serviço para seu funcionamento, seja ele qual for, a primeira coisa a ser feita é a definição do escopo de trabalho. O escopo de um laboratório de microbiologia pode ser muito amplo e composto por um ou mais testes, como:

1. Teste de esterilidade.
2. Ensaio microbiológicos para detecção, isolamento, enumeração e identificação de micro-organismos (bactérias, vírus, parasitas, leveduras e fungos filamentosos) em espécimes clínicos, produtos, superfícies, vestuário e ambiente.
3. Testes de antígenos, toxinas e endotoxinas em diferentes materiais (p.ex., urina, líquido cefalorraquidiano, líquidos orgânicos, soro, fezes, matérias-primas, água, etc.).
4. Avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos, antifúngicos ou quimioterápicos.
5. Ensaio utilizando micro-organismos como parte do sistema-teste.
6. Testes moleculares.
7. Agentes geneticamente modificados.

REQUISITOS PARA FUNCIONAMENTO

O segundo passo para habilitação é providenciar o registro da empresa na prefeitura para requerer o alvará municipal de funcionamento e o alvará sanitário. É importante lembrar que essa documentação deve ser solicitada junto à prefeitura do município em que está localizado o imóvel da empresa. Para o licenciamento, existem vários requisitos e documentações; inicialmente, é necessária a obtenção do Alvará de Aprovação de Edificação nova ou de reforma; depois, o Alvará de Execução de Edificação nova ou de reforma, etc., junto à prefeitura, por meio do Licenciamento de Construção (SLC).

São exigidos também comprovação de dedetização, licenciamento junto ao órgão de meio ambiente do município, perante apresentação de Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (PGRSS), registro no órgão de classe, documentos e programas das áreas trabalhista e previdenciária, como Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional (PCMSO) e Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA), além da comprovação de conformidade com a RDC n. 302, de 13 de outubro de 2005.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), considerando a necessidade de normalização do funcionamento do laboratório clínico e posto de coleta laboratorial, e a relevância da qualidade dos exames laboratoriais para apoio ao diagnóstico eficaz, adotou a RDC n. 302, que é um regulamento técnico para funcionamento dos serviços que realizam atividades laboratoriais, como laboratório clínico e posto de coleta laboratorial, e estabelece que a construção, reforma ou adaptação na estrutura física do laboratório clínico e posto de coleta laboratorial deve ser precedida de apro-

vação do projeto junto à autoridade sanitária local, em conformidade com a RDC/Anvisa n. 50, de 21 de fevereiro de 2002, e RDC/Anvisa n. 189, de 18 de julho de 2003, suas atualizações ou instrumento legal que venha a substituí-las. Define também que as Secretarias de Saúde Estaduais, Municipais e do Distrito Federal devem implementar os procedimentos para adoção do regulamento técnico estabelecido por essa RDC, podendo adotar normas de caráter suplementar, com a finalidade de adequá-lo às especificidades locais. Deve-se lembrar que essa resolução regulamenta todos os serviços de saúde e, portanto, também o laboratório de microbiologia.

Essa resolução define as condições gerais de funcionamento, bem como os requisitos relacionados:

1. Considerações gerais:
 - a. Organização da empresa, considerando desde o alvará de funcionamento até as funções da direção e do responsável técnico.
 - b. Gestão de recursos humanos, equipamentos, produtos para diagnóstico *in vitro*, biossegurança, limpeza, desinfecção e esterilização, e descarte de resíduos e rejeitos.
Obs.: quanto ao descarte de resíduos, deve-se cumprir o estabelecido pela RDC n. 306.
2. Processos operacionais das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica dos exames.
3. Registros.
4. Garantia da qualidade.
5. Controle de qualidade.

Embora seja destinado principalmente a laboratórios clínicos, há necessidade de adequação para laboratórios que realizam ensaios microbiológicos em alimentos e amostras ambientais.

A RDC n. 302, que regulamenta os laboratórios clínicos, estabelece que a construção, reforma ou adaptação na estrutura física do laboratório clínico e posto de coleta laboratorial deve ser precedida de aprovação do projeto junto à autoridade sanitária local, em conformidade com a RDC/Anvisa n. 50, de 21 de fevereiro de 2002, e RDC/Anvisa n. 189, de 18 de julho de 2003, suas atualizações ou instrumento legal que venha a substituí-las.

A RDC/Anvisa n. 50 dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos

assistenciais de saúde, em todo o território nacional, na área pública e privada, compreendendo:

- a. As construções novas de estabelecimentos assistenciais de saúde de todo o país.
- b. As áreas a serem ampliadas de estabelecimentos assistenciais de saúde já existentes.
- c. As reformas de estabelecimentos assistenciais de saúde já existentes e os anteriormente não destinados a estabelecimentos de saúde.

Todos os projetos de estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) devem, obrigatoriamente, ser elaborados em conformidade com as disposições dessa norma. Embora exista uma hierarquia entre as três esferas, o autor ou avaliador do projeto deve considerar a prescrição mais exigente, que eventualmente pode não ser a do órgão de hierarquia superior.

A RDC n. 50 adota várias outras normas como complementares, por exemplo:

- NBR 6.492 – representação de projetos de arquitetura.
- NBR 13.532 – elaboração de projetos de edificações – arquitetura.
- NBR 14.100 – proteção contra incêndio – símbolos gráficos para projetos e outras.

Ela define a terminologia que deve ser utilizada na apresentação da proposta do projeto para avaliação e aprovação. Estabelece que os projetos para a construção, complementação, reforma ou ampliação de uma edificação ou conjunto de edificações serão desenvolvidos, basicamente, em três etapas:

- Estudo preliminar, em que há escolha da solução que melhor responda ao programa de necessidades, de acordo com os aspectos legais, técnicos, econômicos e ambiental do empreendimento.
- Projeto básico, que deve demonstrar a viabilidade técnica da edificação a partir do programa de necessidades e do estudo preliminar desenvolvidos anteriormente, possibilitar a avaliação do custo dos serviços e obras, bem como permitir a definição dos métodos construtivos e prazos de execução do empreendimento. Serão solucionadas as interferências entre os sistemas e componentes da edificação. O projeto básico de arquitetura (PBA) é composto da representação gráfica e relatório técnico, conforme exigência da RDC.

- Projeto executivo, que deve apresentar todos os elementos necessários à realização do empreendimento, detalhando todas as interfaces dos sistemas e seus componentes. Também deve constar do projeto executivo, se solicitado pelo contratante e previsto em contrato, o orçamento analítico da obra e o cronograma físico-financeiro.

A RDC n. 307, de 14 de novembro de 2002, altera a RDC n. 50, de 21 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde, principalmente em áreas nas quais há assistência de pacientes.

O desenvolvimento consecutivo dessas etapas tem como ponto de partida o programa de necessidades (físico-funcional) do estabelecimento assistencial de saúde (EAS), no qual devem estar definidas as características dos ambientes necessárias ao desenvolvimento das atividades previstas na edificação.

É importante enfatizar que:

- a. Só serão analisados pelas vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais os projetos elaborados por técnicos ou firmas legalmente habilitados pelo Conselho Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia (CREA) local, que devem assinar todas as peças gráficas dos projetos respectivos, mencionando o número do CREA, e providenciar sempre a anotação de responsabilidade técnica (ART), correspondente e recolhida na jurisdição em que for elaborado o projeto.
- b. Os desenhos e documentos a serem elaborados devem respeitar a NBR 6.492 e também os requisitos de padronização e unificação da apresentação, por exemplo, o formato das folhas de desenho, a apresentação gráfica do desenho.

Para a execução de qualquer obra nova, de reforma ou de ampliação de EAS, ou seja, um laboratório clínico geral ou especial, é exigida a avaliação do projeto físico em questão pela vigilância sanitária local (estadual ou municipal), que licenciará a sua execução. A avaliação de projetos físicos de EAS exige a documentação denominada PBA – representação gráfica + relatório técnico, baseados na NDC 50. Quando do término da execução da obra e da solicitação de licença de funcionamento do estabelecimento, as vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais farão inspeção no local para verificar a conformidade do construído com o projeto aprovado anteriormente e emitirão um parecer técnico final, aprovando ou não o funcionamento do serviço.

Todo o projeto arquitetônico do laboratório de microbiologia deve ser baseado em uma programação físico-funcional preestabelecida, em que estão determinadas as ações a serem desenvolvidas e as metas a serem alcançadas, assim como estão definidas as distintas tecnologias de operação, delimitando no seu conjunto a listagem de atribuições. Essas atribuições são conjuntos de atividades e subatividades específicas que correspondem a uma descrição sinóptica da organização técnica do trabalho. Por exemplo, prestação de atendimento de apoio ao diagnóstico e terapia a pacientes internos e externos, prestação de serviços de apoio técnico, isto é, atendimento direto a outras instituições em funções de apoio, etc.

Quanto à prestação de atendimento de apoio ao diagnóstico e à terapia, está referenciado na RDC n. 50, no item 4.1, que as atividades da patologia clínica que podem ser extrapoladas para os laboratórios de microbiologia, tanto assistenciais como os de pesquisas, ou de atividades especiais, são:

- Coleta de material (no próprio laboratório ou descentralizada).
- Triagem do material.
- Análise e procedimentos laboratoriais de substâncias ou materiais biológicos com finalidade diagnóstica e de pesquisa.
- Preparo de reagentes/soluções.
- Desinfecção do material analisado a ser descartado.
- Lavagem e preparo do material utilizado.
- Laudo das análises realizadas.

O dimensionamento, a quantificação e as instalações prediais dos ambientes estão estritamente relacionados com as diversas atribuições e atividades dos serviços. Portanto, ao se elaborar o programa arquitetônico de um laboratório, é necessário, antes de elaborar o projeto. Devem-se descrever quais atividades serão realizadas, isto é, qual será seu escopo, e assim identificar os ambientes necessários para a realização dessas atividades. Não é correto listar ambientes sem saber antes que tipos de atividades serão desenvolvidas no local. A norma não estabelece uma tipologia de edifícios de saúde, como laboratório geral, de microbiologia ou de análise microbiológica de água para serviços de hemodiálise e edifício de pesquisa, mas trata genericamente todos esses edifícios como EAS, que devem se adequar às peculiaridades epidemiológicas, populacionais e geográficas da região em que estão inseridos.

A existência ou não de um determinado ambiente depende da execução ou não da atividade correspondente. Entretanto, em alguns casos, o fato de determinada atividade ser realizada não garante a existência de ambiente específico para essa atividade, pois ela eventualmente pode ser executada junto com outra atividade em um determinado ambiente. Os ambientes em cuja coluna-quantificação aparecem numerais ou fórmulas matemáticas identificando a quantidade ou medida mínima são obrigatórios, ou seja, quando a unidade existir, assim como a atividade correspondente, esses ambientes obrigatoriamente devem estar presentes. Os demais são optativos, dependendo do tipo do estabelecimento.

Se o laboratório faz atendimento ao paciente, há necessidade de um ambiente de apoio para seu acolhimento. Esse ambiente deve conter, levando sempre em consideração a acessibilidade:

- Sala de espera para pacientes e acompanhantes.
- Área para registro de pacientes/marcação.
- Sanitários para pacientes e público (masculino e feminino).
- Sanitários para pacientes.
- Sanitários para funcionários.
- Depósito de equipamentos e cadeiras de rodas.
- Sala administrativa.
- Copa para funcionários.
- Depósito de material de limpeza (DML).

A RDC n. 50 define as normas na unidade funcional: 4 – Apoio ao diagnóstico e terapia, na área de Patologia Clínica:

- a. *Box* de coleta de material: 1 para cada 15 coletas/hora, 1,5 m² por *box*. Um dos *boxes* deve ser destinado à maca e com dimensão para tal. Estas são as dimensões para o *box* de coleta de secreções, já o *box* de coleta de urina deve ter acoplado um banheiro exclusivo para o paciente em questão.
- b. Sala para coleta de material, caso haja só um ambiente de coleta: 3,6 m².
- c. Área para classificação e distribuição de amostras: 3 m².
- d. Sala de preparo de reagentes: 3 m².
- e. Laboratório de bacteriologia ou microbiologia, laboratório de micologia e laboratório de virologia:
 - Antecâmara de paramentação.
 - Sala de manuseio de células.

- f. Laboratório de biologia molecular:
- Sala de preparo de soluções: 9 m².
 - Sala de extração de ácidos nucleicos: 8,5 m².
 - Antecâmara de paramentação exclusiva para acesso à sala de PCR: 2,8 m².
 - Sala de PCR (amplificação).
 - Área de preparo de géis.
 - Sala de revelação de géis *in loco* no laboratório ou não: 4 m².
- g. Salas administrativas.
- h. Depósito de equipamentos e materiais.
- i. Depósito de material de limpeza.

Obs.: os laboratórios podem estar localizados em um único salão, separados por áreas e bancadas específicas, dependendo do nível de biossegurança e condições ambientais necessárias para o controle de infecção. De acordo com as exigências dos procedimentos realizados em cada um dos laboratórios, pode ou não ser necessária a existência de sala exclusiva, inclusive com antecâmara, como é caso do laboratório de micobactérias/tuberculose.

As condições ambientais de controle de infecção possuem dois componentes técnicos indispensáveis e complementares:

- Componente em relação a pessoas, utensílios, roupas e resíduos (RSS).
- Componente referente a uma série de elementos construtivos, como: padrões de circulação, sistemas de transportes de materiais, equipamentos e resíduos sólidos; sistemas de renovação e controle das correntes de ar, facilidades de limpeza das superfícies e materiais; e instalações para a implementação do controle de infecções.

O papel da arquitetura na prevenção das infecções de serviços de saúde, que deve ser extrapolado para o laboratório de microbiologia, pode ser entendido em seus aspectos de barreiras, proteções, meios e recursos físicos, funcionais e operacionais, relacionados a pessoas, ambientes, circulações, práticas, equipamentos, instalações, materiais, RSS e fluidos. Limitam-se a prevenção e o controle de infecção de origem interna ao EAS, no que se refere a água, esgoto, roupa, resíduos, alimentos, ar-condicionado, equipamento de esterilização, destilador de água, etc., além da prevenção de doenças ocupacionais dos funcionários e profissionais.

As precauções-padrão constituem-se em barreiras e ênfase nos cuidados com certos procedimentos, visando a evitar que a equipe de assistência tenha contato direto ou indireto com os diversos líquidos corporais, secreções, agulhas, instrumentos e equipamentos inclusos nos diversos procedimentos. O projeto deve contemplar estratégias contra a transmissão de infecções adquiridas em seu recinto por meio do zoneamento dos setores, segundo sua sensibilidade ao risco de transmissão de infecção, tanto individual como coletivo ou ambiental.

A minimização do risco de disseminação, aquisição e/ou transmissão de micro-organismos envolve as medidas de biossegurança em laboratórios, aplicadas por meio de um conjunto de práticas, equipamentos e instalações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes a atividades de prestação de serviços, pesquisas, produção e ensino, visando à saúde dos homens, à preservação do ambiente e à qualidade dos resultados.

LABORATÓRIO DE MICOBACTÉRIAS

Um dos laboratórios de microbiologia que apresentam características especiais é o de micobactérias (tuberculose – TB).

O Manual de Segurança Biológica em Laboratório da Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a avaliação dos riscos dos procedimentos para as redes de laboratórios da TB seja feita para cada um dos laboratórios, com o intuito de identificar práticas, abordagens e cuidados apropriados de acordo com suas atividades. O atual Manual difere do anterior ao fornecer recomendações baseadas em procedimentos laboratoriais, usados especificamente no diagnóstico da TB e que são tipicamente realizados por diferentes níveis de serviços da TB. Os níveis de biossegurança baseiam-se em uma combinação de características de projeto, construção, instalações de contenção, equipamentos, práticas e procedimentos operacionais exigidos para o trabalho com agentes dos vários grupos de risco. Com frequência entende-se, erroneamente, que um micro-organismo atribuído a um grupo de risco (p.ex., grupo de risco 3) exige um laboratório de nível de biossegurança análogo (ou seja, nível de biossegurança 3) para a realização segura do trabalho. Na verdade, um nível mais alto ou mais baixo de biossegurança pode ser mais apropriado, conforme o procedimento específico realizado associado a outros fatores das boas práticas do trabalho.

Considerando essas regras, as instalações dos laboratórios de TB podem ser classificadas em três níveis principais de risco, tomando como base as atividades realizadas e riscos associados:

- Baixo risco de TB.
- Risco moderado de TB.
- Alto risco de TB (como um laboratório de contenção de TB).

O Manual de Segurança Biológica em Laboratório da OMS recomenda que seja usada uma câmara de segurança biológica sempre que sejam manipuladas amostras infecciosas. O grupo de peritos considera que, com boas técnicas microbiológicas, a baciloscopia direta da expectoração oferece baixo risco de gerar aerossóis infecciosos; conseqüentemente, esse procedimento pode ser realizado em bancada aberta, desde que seja assegurada ventilação adequada. Essa recomendação é consistente com as orientações anteriores.

O método para avaliação dos riscos de um laboratório de TB deve considerar:

- Carga bacilar dos materiais (como amostras de expectoração e culturas) e viabilidade dos bacilos de TB.
- Via de transmissão da TB, que é respiratória, portanto por meio de aerossóis.
- Se o material manipulado e as manipulações necessárias para cada procedimento são propensos a gerar aerossóis infecciosos.
- Volume de trabalho do laboratório e respectivo pessoal.
- Localização do laboratório, por exemplo, se está dentro ou fora de um hospital.
- Características epidemiológicas da doença e do grupo de doentes atendido pelo laboratório.
- Nível de experiência e competência dos técnicos do laboratório.
- Condição física do pessoal do laboratório, especialmente técnicos de HIV positivo.

Assim como todo laboratório, o laboratório de microbiologia de TB deve ser dividido em duas áreas:

1. Uma técnica, composta pelas instalações de ensaio, onde são realizados os testes microbiológicos e as atividades correlacionadas. Esta pode ser considerada a área suja ou de risco.
2. Uma área de instalações auxiliares, onde ficam os acessos, corredores, setor administrativo, vestiário, banheiros, almoxarifados, arquivos, etc. Esta pode ser considerada a área limpa.

A concepção adequada, assim como a construção propriamente dita das suas instalações, deve contribuir para a proteção dos seus funcionários e proporcionar uma barreira que proteja as pessoas da comunidade contra aerossóis com bacilos da TB que possam ter sido gerados na área de trabalho. As características do laboratório, incluindo áreas separadas e seu sistema de ventilação específico, são medidas secundárias de contenção que devem sempre estar associadas à classificação do nível do laboratório: baixo, moderado ou alto risco de TB.

O projeto de construção deve ser estabelecido após a classificação de risco, e as características básicas recomendadas são:

1. Ventilação adequada e fluxo de ar direcional.
2. Espaço amplo para a área técnica, com normas de limpeza e manutenções adequadas.
3. Paredes, pisos e tetos seguindo normas da RDC n. 50.
4. As bancadas devem ser impermeáveis à água e resistentes aos produtos químicos normalmente utilizados no laboratório e também ao calor.
5. Local para lavagens de mãos com dispensador de sabão e de toalhas próximo do lavatório, com torneiras com sensores ou de fechamento automático.
6. Proibida área de alimentação e de descanso dentro da área de trabalho.
7. As portas do laboratório devem ser à prova de fogo, com visor de vidro, de preferência com fechamento automático.
8. Fornecimento de água e energia deve seguir as normas da RDC n. 50.

Em considerações gerais, existem quatro níveis de biossegurança, NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4, crescentes no maior grau de contenção e complexidade do nível de proteção, que consistem em combinações de práticas e técnicas de laboratório e barreiras primárias e secundárias de laboratório.

O responsável técnico pelo laboratório é o responsável pela avaliação dos riscos e pela aplicação adequada dos níveis de biossegurança, em função dos tipos de agentes e das atividades a serem realizadas. Podem ser adotadas práticas mais ou menos rígidas quando existir informação específica disponível que possa sugerir a virulência, a patogenicidade, os padrões de resistência a antibióticos, a vacina e a disponibilidade de tratamento, ou outros fatores significativamente alterados.

1. O nível de biossegurança 1 representa um nível básico de contenção, que se baseia nas práticas padrões de microbiologia sem indicação de barreiras

primárias ou secundárias, com exceção de uma pia para a higienização das mãos. Acesso limitado.

2. O nível de biossegurança 2 é o nível em que as práticas, os equipamentos, o projeto e a construção são aplicáveis aos laboratórios clínicos, de diagnóstico, laboratórios-escolas e outros laboratórios nos quais o trabalho é realizado com maior espectro de agentes nativos de risco moderado presentes na comunidade e que estejam associados a uma patologia humana de gravidade variável. Com boas técnicas de microbiologia, esses agentes podem ser usados de maneira segura em atividades conduzidas sobre uma bancada aberta, uma vez que o potencial para a produção de borrifos e aerossóis é baixo. Este nível é adequado para qualquer trabalho que envolva sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou linhas de células humanas primárias, em que a presença de um agente infeccioso pode ser desconhecida. Embora os organismos rotineiramente manipulados no nível de biossegurança 2 não sejam transmitidos por meio de aerossóis, os procedimentos envolvendo alto potencial para a produção de salpicos ou aerossóis que possam aumentar o risco de exposição dos funcionários devem ser conduzidos com equipamento de contenção primária ou dispositivos como a cabine de segurança biológica (CSB) ou os copos de segurança da centrífuga. Outras barreiras primárias, como escudos para borrifos, proteção facial, aventais e luvas, devem ser utilizadas. As barreiras secundárias, como pias para higienização das mãos e instalações para descontaminação de lixo, devem existir com o objetivo de reduzir a contaminação potencial do meio ambiente. Acesso controlado.
3. O nível de segurança 3 envolve as práticas, o equipamento de segurança, o planejamento e a construção das dependências que são aplicáveis para laboratórios clínicos, de diagnósticos, laboratório-escola, de pesquisa ou de produções. Nesses locais, realiza-se o trabalho com agentes nativos ou exóticos que possuam potencial de transmissão via respiratória e que possam causar infecções sérias e potencialmente fatais. O *Mycobacterium tuberculosis*, o vírus da encefalite de St. Louis e a *Coxiella burnetii* são exemplos de micro-organismos determinados para esse nível. Os riscos primários causados aos trabalhadores que lidam com esses agentes incluem a autoinoculação, a ingestão e a exposição aos aerossóis infecciosos. Nesse nível, enfatizam-se mais as barreiras primárias e secundárias para proteger os funcionários de áreas contíguas, a comunidade e o meio ambiente contra a exposição aos aerossóis potencialmente infecciosos. Por exemplo, todas as manipulações laboratoriais devem ser realizadas em CSB ou em outro equipamento de contenção, como

uma câmara hermética de geração de aerossóis. As barreiras secundárias para esse nível incluem o acesso controlado ao laboratório e sistemas de ventilação que minimizam a liberação de aerossóis infecciosos do laboratório. É necessária a troca de roupa antes de entrar. As instalações devem conter sala de paramentação, dependendo com área de saída com banho de ducha e todo material deve ser descontaminado na saída das instalações. Edifício separado ou área isolada, com acesso controlado.

4. O nível de biossegurança 4, no qual as práticas, o equipamento de segurança, o planejamento e a construção das dependências são aplicáveis para trabalhos que envolvam agentes exóticos perigosos que representam um alto risco por provocarem doenças fatais em indivíduos. Esses agentes podem ser transmitidos via aerossóis e até o momento não há nenhuma vacina ou terapia disponível. Os agentes que possuem relação antigênica próxima ou idêntica aos dos agentes do nível de biossegurança 4 também devem ser manuseados nesse nível. Quando possuírem dados suficientes, o trabalho com esses agentes deve continuar nesse nível ou em um nível inferior. Os vírus como os de Marburg ou da febre hemorrágica Crimeia-Congo são manipulados nesse nível. Todas as manipulações de materiais de diagnóstico potencialmente infecciosos, substâncias isoladas e animais natural ou experimentalmente infectados apresentam alto risco de exposição e infecção aos funcionários de laboratório, à comunidade e ao meio ambiente. Cuidados que estabeleçam o completo isolamento dos trabalhadores de laboratórios em relação aos materiais infecciosos aerossolizados são realizados primariamente em CSB classe III ou com macacão individual suprido com pressão de ar positiva. A instalação do nível de biossegurança 4 é geralmente construída em um prédio separado ou em uma zona completamente isolada com uma complexa e especializada ventilação e sistemas de gerenciamento de lixo que evitem a liberação de agentes viáveis no meio ambiente.

As barreiras primárias contribuem para a proteção da equipe do estabelecimento de saúde, proporcionando uma barreira de proteção para as pessoas que se encontram fora do laboratório contra agentes infecciosos que podem ser liberados acidentalmente pelo ambiente.

As barreiras secundárias recomendadas dependem do risco de transmissão dos agentes específicos.

Quando o risco de contaminação por meio da exposição aos aerossóis infecciosos estiver presente, níveis mais elevados de contenção primária e barreiras de

proteção secundárias podem ser necessários para evitar que agentes infecciosos escapem para o meio ambiente. Essas características do projeto incluem sistemas de ventilação especializados em assegurar o fluxo de ar unidirecionado, sistemas de tratamento de ar para a descontaminação ou remoção do ar liberado, zonas de acesso controlado, câmaras pressurizadas como entradas de laboratório separadas ou módulos para isolamento do laboratório.

PROJETO EXECUTIVO

Acabamentos de paredes, pisos, tetos e bancadas

Os requisitos de limpeza e sanitização de pisos, paredes, tetos, pias e bancadas devem seguir as normas contidas no manual Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde, do Ministério da Saúde/Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar, ou o que vier a substituí-lo.

Os materiais adequados para o revestimento de paredes, pisos e tetos de ambientes de áreas críticas (níveis 3 e 4) e semicríticas (níveis 1 e 2) devem ser resistentes à lavagem e ao uso de desinfetantes. Os materiais, cerâmicos ou não, quando usados nas áreas críticas, não podem ter índice de absorção de água superior a 4% individualmente ou depois de instalados no ambiente, além disso, o rejunte de suas peças, quando existir, também deve ser de material com esse mesmo índice de absorção. O uso de cimento sem qualquer aditivo antiabsorvente para rejunte de peças cerâmicas ou similares é vedado tanto nas paredes como nos pisos das áreas críticas.

As tintas elaboradas a base de epóxi, PVC, poliuretano ou outras destinadas a áreas molhadas podem ser utilizadas nas áreas críticas tanto nas paredes e tetos como nos pisos, desde que sejam resistentes à lavagem, ao uso de desinfetantes e não sejam aplicadas com pincel. Quando utilizadas no piso, devem resistir também a abrasão e a possíveis impactos.

O uso de divisórias removíveis nas áreas críticas não é permitido, entretanto, paredes pré-fabricadas podem ser usadas, desde que, quando instaladas, tenham acabamento monolítico, ou seja, não possuam ranhuras ou perfis estruturais aparentes e sejam resistentes à lavagem e ao uso de desinfetantes. Nas áreas semicríticas, níveis I e II, as divisórias só podem ser utilizadas se forem, também, resistentes ao uso de desinfetantes e à lavagem com água e sabão.

Nas áreas críticas e semicríticas, não devem haver tubulações aparentes nas paredes e tetos.

A execução da junção entre o rodapé e o piso deve ser realizada de modo que permita a completa limpeza do canto formado. Especial atenção deve ser

dada à união do rodapé com a parede, de modo que ambos estejam alinhados, evitando-se o tradicional ressalto do rodapé, que permite o acúmulo de pó e é de difícil limpeza.

Instalação de climatização

É preciso haver sempre ventilação adequada e fluxo de ar direcional. Portanto, é necessária atenção especial quanto ao tipo e à forma de instalação do ar-condicionado, da exaustão, quando necessária, e da ventilação, que deve seguir as normas de acordo com a classificação de risco da área. A norma que regulamenta a climatização é a ABNT NBR 6401.

Esgoto sanitário

As normas para a adequação do esgoto sanitário não estão descritas na RDC n. 50, por isso devem ser adotadas como complementares as seguintes normas regulamentadoras das instalações hidrossanitárias:

- ABNT NBR 8.160 – sistemas prediais de esgoto sanitário – projeto e execução.
- NBR 7.229 – projeto, construção e operação de sistemas de tanques sépticos.
- NBR 13.969 – tanques sépticos – unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos – projeto, construção e operação.
- CNEN NE – 6.05 – gerência de rejeitos, radioativos em instalações radioativas.
- CNEN NE – 3.05 – requisitos de radiação e segurança para serviços de medicina nuclear.
- NBR 5.626 – instalação predial de água fria.
- NBR 8.160 – sistemas prediais de esgoto sanitário.

As instalações de esgoto sanitário do EAS devem dispor, além das caixas de separação de materiais usuais, aquelas específicas para os rejeitos das atividades desenvolvidas:

- Caixa de separação de material químico em atividades de laboratório: deve ser observada a natureza do elemento químico e o quantitativo de uso deste para definição da necessidade ou não de instalação da caixa.
- Caso a região em que o laboratório esteja localizado tenha rede pública de coleta e tratamento de esgoto, todo o esgoto resultante do laboratório pode

ser lançado nessa rede sem qualquer tratamento. Não havendo rede de coleta e tratamento, todo o esgoto deve receber tratamento antes de ser lançado em rios, lagos, etc. (se for o caso).

Gás combustível

As instalações para gases devem atender à NB 98 – armazenamento e manuseio de líquidos combustíveis e inflamáveis.

Condições de segurança contra incêndio

Entende-se por setorização para fins de segurança contra incêndio a divisão das unidades funcionais e ambientes do EAS em setores com características específicas em relação a população, instalações físicas e função, tendo em vista subsidiar o zoneamento de incêndios, por exemplo, área em que há bico de Bunsen.

Existem várias normatizações brasileiras referente à segurança contra incêndio em edificações urbanas a serem observadas; algumas que são relacionadas ao laboratório são:

- NBR 5.628 – componentes construtivos estruturais. Determinação da resistência ao fogo.
- NBR 9.077 – saídas de emergência em edifícios.
- NBR 11.711 – portas e vedadores corta-fogo com núcleo de madeira para isolamento de riscos em ambientes comerciais e industriais.
- NBR 12.693 – sistemas de proteção por extintores de incêndio.
- NBR 13.434 – sinalização de segurança contra incêndio e pânico – formas, dimensões e cores.
- NBR 13.437 – símbolos gráficos para sinalização contra incêndio e pânico.

HABILITAÇÃO PARA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Quando o laboratório pretende obter um certificado de habilitação diante de uma certificadora de qualidade na área, é necessário o cumprimento dos requisitos exigidos pela norma específica. Por exemplo:

- Aquisição de habilitação junto à Rede Brasileira de Laboratórios (REBLAS): devem ser cumpridos os contidos na Norma Internacional Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, a ISO/IEC 17025 1.ª ed., 1999, chamada de ISO 17025. Embora sejam destinados prin-

principalmente a ensaios microbiológicos ambientais e de alimentos, os princípios gerais podem ser aplicados a outras áreas. Esse documento pode ser considerado um “documento de aplicação” para ensaios microbiológicos, conforme descrito no Anexo B da ISO 17025.

- Aquisição da certificação Sistema de Credenciamento ou Acreditação, oferecida pelo DICQ – Sistema Nacional de Acreditação: deve buscar a norma específica.
- Aquisição da certificação da Organização Nacional de Acreditação (ONA): deve buscar a norma específica.
- Aquisição da certificação de acreditação do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos: deve buscar a norma específica.

Lembrando que todas as certificadoras apresentam suas normas específicas, exigindo inclusive requisitos de ambiente e segurança no laboratório, mas nunca estão em desacordo com as resoluções e normas regulamentadoras.

BIBLIOGRAFIA

1. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC N°. 50, de 21 de fevereiro de 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ca36b200474597459fc8df3fbc4c6735/RDC+N%C2%BA.+50,+DE+21+DE+FEVEREIRO+DE+2002.pdf?MOD=AJPERES>.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC N°. 302, de 13 de outubro de 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancado-paciente/documentos/rdcs/RDC%20N%C2%BA%20302-2005.pdf>.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC N°. 306, de 07 de dezembro de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancado-paciente/documentos/rdcs/RDC%20N%C2%BA%20306-2004.pdf>.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Habilitação para laboratórios de microbiologia. Disponível em : http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5d4ab20043438bd7a6b9bf0ea87ebc91/ACREDITACAO_3.pdf?MOD=AJPERES.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_2_2004.pdf.
6. Brasil. Ministério da Saúde/Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. 2ª ed. Brasília. 1994.
7. Organização Nacional de Acreditação – ONA. Disponível em: <https://www.ona.org.br/Inicial>.
8. Sistema Nacional de Acreditação – DICQ. Disponível em: <http://www.sbac.org.br>.

9. Prefeitura de São Paulo. Alvarás/certificados disponíveis. http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/sp_mais_facil/slc/alvaras_e_certificados/index.php?p=25679.
10. Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos da SBP/ML- PALC. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/?C=136>.

2. Biossegurança

O conhecimento sobre Biossegurança deveria estar associado aos interesses daqueles que lidam com os serviços de saúde. Os trabalhadores da área voltam para suas casas todos os dias, passeiam, viajam e têm uma vida como qualquer outra pessoa. Durante a jornada de trabalho, estão expostos a um risco invisível e, por vezes, desconhecido, que podem carregar para outros ambientes. (Editorial do Boletim informativo Anvisa – agosto de 2005)

INTRODUÇÃO

Não existe discussão quanto ao risco que os colaboradores do laboratório de microbiologia têm ao se exporem a agentes infecciosos. As rotas mais frequentes de contaminação dos profissionais acontecem por inalação de aerossóis produzidos por acidente, pelo processamento de amostras contaminadas com esses agentes ou pela inoculação com agulhas contaminadas.

A biossegurança no laboratório pode ser traduzida como um conjunto de práticas, equipamentos e instalações voltadas para a prevenção, minimização ou até eliminação de riscos inerentes às atividades realizadas no ambiente de trabalho, pensando em preservar a saúde dos colaboradores, o meio ambiente e a qualidade dos trabalhos desenvolvidos. Esse conjunto de atividades e itens deve estar descrito no manual de biossegurança do laboratório e a linguagem adequada deve ser propagada entre todos os colaboradores. Na Tabela 1, há algumas definições que precisam ser explicadas a todos os colaboradores e devem constar no manual em questão.

Uma série de barreiras tem sido desenvolvida ao longo do tempo para proteger os colaboradores e é referida em várias publicações como barreiras

de contenção. Essas barreiras de contenção são uma combinação de práticas pessoais e técnicas, equipamentos de proteção individual e adequação física do laboratório para minimizar a exposição aos agentes biológicos. Os agentes biológicos, por sua vez, são classificados de acordo com o risco de causar infecção em quatro níveis (Tabela 2) e dependendo do risco que podem causar ao colaborador ou ao meio ambiente é que se determina o nível de contenção que o laboratório deve ter.

Tabela 1 Definições importantes para o bom entendimento de biossegurança no laboratório de microbiologia

Aerossóis: micropartículas sólidas ou líquidas com aproximadamente 0,1 a 50 micras, constituídas de micro-organismos, matéria orgânica e fragmentos expelidos pela boca. Podem permanecer em suspensão por várias horas em condições viáveis e podem alcançar longas distâncias. As partículas maiores caem no chão e se juntam às sujidades, sendo ressuspensas pelo movimento das pessoas no ambiente, contaminando roupas, superfície do mobiliário e a pele. Podem provocar contaminação biológica e química

Descontaminação: processo de desinfecção ou esterilização terminal de superfícies e objetos contaminados com micro-organismos patogênicos, de forma a torná-los seguros à manipulação

Desinfecção: processo de eliminação ou destruição de todos os micro-organismos, na forma vegetativa, presentes em objetos inanimados, por meio de meios químicos ou físicos. A desinfecção não destrói os esporos de bactérias

Equipamento de proteção individual (EPI): jalecos, toucas, visor ou escudo facial, óculos de proteção, luvas, botas e sapatos antiderrapantes e impermeáveis, máscaras e outros. São de uso individual e intransferível

Equipamento de proteção coletiva (EPC): cabine de segurança biológica, capela de exaustão, exaustor, extintor de incêndio, chuveiro, lava-olhos, sinalização, entre outros

Esterilização: processo de eliminação de todos os tipos de micro-organismos, inclusive de esporos, com produtos químicos ou meios físicos

Infecção: doença caracterizada pela presença de agentes infecciosos, que causam danos em determinados órgãos ou tecidos do organismo. Produz febre, dor, eritema, edema, alterações sanguíneas e, por vezes, secreção purulenta

(continua)

Tabela 1 Definições importantes para o bom entendimento de biossegurança no laboratório de microbiologia (continuação)

Material perfurocortante: material pontiagudo, como agulhas, fragmento de vidros, bisturis e outros. Podem perfurar e/ou cortar

Micro-organismos: formas de vida de dimensões microscópicas. Organismos visíveis individualmente apenas ao microscópio. Abrangem bactérias, vírus, fungos e protozoários

Patogenicidade: capacidade de um micro-organismo causar doença em um hospedeiro suscetível

Resíduos: materiais considerados sem utilidade por seu possuidor

Tabela 2 Classificação dos grupos de riscos dos agentes biológicos

| Classe de risco | Risco individual | Risco para o meio ambiente | Risco de infecção |
|-----------------|------------------|----------------------------|--|
| 1 | Baixo/ausente | Baixo/ausente | Nenhum risco ou baixa probabilidade de causar infecção no homem |
| 2 | Moderado | Baixo | Pode causar infecções no homem e existem medidas terapêuticas ou profiláticas eficazes. Risco de propagação da infecção é limitado |
| 3 | Elevado | Moderado | Pode causar infecções graves no homem, podendo infectar outras pessoas. Existem medidas terapêuticas e/ou profilaxia |
| 4 | Elevado | Elevado | Altamente patogênicos e de grande poder de transmissibilidade de uma pessoa para outra, direta ou indiretamente. Não existem medidas terapêuticas ou profiláticas conhecidas |

MANUAL DE BIOSSEGURANÇA

Todo laboratório deve elaborar o seu manual de biossegurança e incluir cuidados especiais para o setor de microbiologia. O manual deve ser escrito de forma simples, de modo que incentive as pessoas a o ler. Devem-se incluir várias

tabelas, gráficos e quadros, em que os tópicos mais importantes estejam descritos de maneira sucinta e completa. Também deve ser feito um treinamento referente ao conteúdo do manual com todos os colaboradores, seguido de uma prova de avaliação de conhecimento para comprovar a eficácia do treinamento, já que as normas contidas no manual são de extrema importância para o bom andamento do laboratório e a redução de riscos.

MELHORES PRÁTICAS LABORATORIAIS (BOAS PRÁTICAS EM LABORATÓRIO CLÍNICO – BPLC)

Como dito, a biossegurança se define por um conjunto de atividades, sendo a primeira as boas práticas em laboratório clínico. Quando se fala em boas práticas, refere-se às atividades operacionais no laboratório, uma série de regras ou normas que deve ser instituída, orientada e disponível para todos os colaboradores do laboratório, juntamente com as normas da Norma Reguladora 32 – Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde (NR 32). A Tabela 3 cita algumas das práticas mais importantes para o laboratório de microbiologia, sendo que outras podem ser agregadas, dependendo das normas específicas da instituição e das atividades desempenhadas.

Apesar do treinamento e conhecimento das boas práticas em laboratório, é necessário também realizar treinamentos específicos e periódicos sobre normas para laboratórios de microbiologia e avaliação da eficácia desses treinamentos (avaliação da competência dos colaboradores).

Tabela 3 Práticas de biossegurança para o laboratório de microbiologia

| | Descrição |
|------------------------|---|
| Conduta do colaborador | Proibido comer, beber, fumar, guardar alimentos e aplicar cosméticos na área técnica |
| | Cabelos longos devem estar sempre presos durante a jornada de trabalho. Evitar o uso de adornos como joias, bijuterias e outros adereços. É vedado o uso de calçados abertos (chinelos e sandálias) |
| | É obrigatório o uso de EPI na área de trabalho |
| | Proibido pipetar com a boca. Utilizar pipetas automáticas |
| | Proibido reencapar e entortar agulhas após o uso. Descartar em recipiente apropriado |

(continua)

Tabela 3 Práticas de biossegurança para o laboratório de microbiologia (continuação)

| | Descrição |
|---------------------------|--|
| Conduta do colaborador | É obrigatória a descontaminação das bancadas de trabalho antes e após o desenvolvimento das atividades |
| | Manter organizadas todas as áreas de trabalho |
| | Tirar o jaleco quando sair do setor e colocar em local apropriado. Higienizar corretamente as mãos ao sair e entrar na área de trabalho e durante procedimentos em que houver contaminação das mãos ou das luvas |
| | Tomar as vacinas exigidas |
| | Notificar acidente ou incidente ocorrido na área envolvida ao supervisor para que sejam tomadas as devidas providências |
| Ambiente e infraestrutura | Determinar as áreas limpas e contaminadas, sinalizando claramente |
| | Depositar todo material contaminado utilizado em recipientes apropriados para autoclavagem prévia, antes do descarte final |
| | Os equipamentos devem ser descontaminados antes de serem transportados para fora do laboratório ou realocados |
| | Segregar e acondicionar adequadamente resíduos biológicos, químicos e ionizantes |
| | Acesso ao laboratório é restrito às pessoas autorizadas; visitantes devem receber EPI para entrar |
| | Todos os profissionais devem ser informados sobre as saídas de emergência, os avisos de segurança e a localização dos equipamentos de segurança e como os utilizar |
| | Os cilindros de gases devem sempre estar devidamente acorrentados e identificados |
| | Estabelecer o controle efetivo dos insetos e roedores (Programa de Gerenciamento Integrado de Roedores e de Insetos – PGIRI) |
| | Não utilizar botijões de gás doméstico dentro do laboratório |
| | A utilização de incinerador elétrico de bancada é recomendada pela contenção de aerossóis na flambagem de alças e fios bacteriológicos |

EPI: equipamento de proteção individual.

INSTALAÇÕES

A infraestrutura ou o desenho do laboratório de microbiologia é uma importante barreira de proteção para os colaboradores que exercem suas atividades dentro da área de trabalho e protege as áreas externas ao laboratório. A área física ocupada pelo laboratório deve ser planejada de acordo com os materiais clínicos que serão manipulados e o risco dos agentes porventura isolados. De acordo com a RDC 50, o Center for Disease Control and Prevention (CDC) e o National Institute of Health (NIH), classificam-se os laboratórios em quatro níveis. Na Tabela 4, podem ser verificadas as características específicas de infraestrutura e de condutas relacionadas aos micro-organismos que estão sendo isolados no laboratório, dependendo do nível. Em geral, os laboratórios de microbiologia clínica são considerados nível 2 ou 3.

Tabela 4 Resumo dos níveis de segurança recomendados para agentes infecciosos

| Nível | Classificação do agente | Agente | Conduitas | EPI e EPC | Equipamentos necessários |
|-------|---|--|--|---|---|
| 1 | Não causam doenças | <i>Bacillus subtilis</i> | Boas práticas de laboratório | Jaleco | Pia, lava-olhos, capela |
| NB-1 | ao homem | Protozoários de vida livre | | Luva e óculos ou viseira de proteção, se necessário | de exaustão se houver manipulação de agentes químicos |
| 2 | Associados com | Micro-organismos causadores de infecções (p.ex., <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , entre outros) | Conduitas do nível 1 | Cabine de segurança biológica (classe II) | Necessidades do nível 1 |
| NB-2 | doenças | Vírus da hepatite | Acesso limitado Sinalização de infectante Cuidados com perfurocortantes Normas para descontaminação Procedimento de biossegurança disponível e de fácil acesso | Jaleco, luvas e óculos ou viseiras de proteção | Descontaminação antes do descarte de resíduos (p.ex: autoclavação) |
| 3 | Associados com danos potencialmente letais | Todos os agentes mencionados no nível 2 mais <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Brucella</i> spp | Conduitas do nível 2 | EPI do nível 2 | Necessidades do nível 2 |
| NB-3 | | | Acesso controlado com antessala | Jaleco adicional (descartável) | Sistema de exaustão controlado e exclusivo |
| | | | Descontaminação de todo o lixo com autoclave | Cabine de segurança biológica classe II dutada para fora da área do laboratório | de pressão negativa sem recirculação do ar; porta com fechamento automático |
| 4 | Associados a alto | Arenavírus (Lassa, Junin, Machupo), filovírus (Ebola) | Conduitas do nível 3 | Máscara apropriada (N95) | Necessidades do nível 3 |
| NB-4 | risco de transmissão por aerossóis ou risco de transmissão desconhecida | | Troca de roupa na entrada Ducha na saída Descontaminação antes de sair das instalações | EPI do nível 3 Cabine de segurança biológica classe III Roupas especiais com sistema individual de pressão positiva | Laboratório em edifício isolado ou em área isolada |

EPI: equipamento de proteção individual; EPC: equipamento de proteção coletiva.

Fonte: Oplustil et al., 2010.

EQUIPAMENTOS

Os equipamentos para garantir a segurança dos colaboradores são descritos como equipamentos de proteção individual (EPI) e equipamentos de proteção coletiva (EPC). A Tabela 5 exemplifica os EPI utilizados no laboratório, o tipo de risco que é evitado e quais são as características importantes que esses equipamentos devem ter. Na Tabela 6, estão descritas algumas das atividades mais frequentes realizadas no laboratório e que tipo de EPI ou EPC deve ser empregado.

Tabela 5 Equipamentos de proteção individual e suas características

| EPI | Risco que evita | Características de segurança |
|-------------------|--|---|
| Jalecos, aventais | Contaminação da roupa | Mangas longas para proteger braços e até os joelhos para proteger a maior parte do corpo no caso de derramamento de qualquer substância |
| Sapatos | Impacto e de derramamento | Fechados |
| Óculos | Respingos nos olhos | Resistentes a impactos, podem ter grau, permite o uso sob os óculos de grau. Proteção lateral |
| Viseira | Respingos nos olhos e na boca | Permite o uso sob os óculos de grau. Proteção total do rosto. Facilmente higienizáveis |
| Respiradores | Protege contra inalação de aerossóis | As mais adequadas são as tipo N95, podem ser utilizadas mais de uma vez |
| Luvas | Contato direto com micro-organismos. Protege em caso de lesões na pele | Descartáveis e do tamanho adequado para as mãos dos colaboradores. Látex, vinil ou nitrilo |

EPI: equipamento de proteção individual.

Tabela 6 Equipamentos de proteção individual e coletiva para as atividades mais frequentemente realizadas no laboratório

| Atividades | EPI/EPC |
|--|---|
| Processamento inicial das amostras biológicas | Luvas, jaleco, cabine de segurança biológica |
| Subcultivo de hemoculturas | Luvas, jaleco, cabine de segurança ou óculos ou viseira de proteção |
| Subcultivo de colônias ou meios em caldo | Jaleco, óculos ou viseira de proteção, luvas |
| Repique em meios de identificação | Jaleco, óculos ou viseira de proteção, luvas |
| Realização de antibiograma | Jaleco, óculos ou viseira de proteção, luvas |
| Manipulação de culturas positivas de micobactérias | Cabine de segurança apropriada, luvas, jalecos, respirador N95, centrífuga com caçapa protegida |

EPI: equipamento de proteção individual; EPC: equipamento de proteção coletiva.

Fonte: adaptado de Oplustil et al., 2010.

Entre os EPC utilizados no laboratório de microbiologia, a cabine de segurança biológica é o equipamento de maior importância, e requer maior cuidado e controle, já que o operador se sente confiante por estar utilizando um equipamento com proteção completa (operador, amostra e ambiente). Existem várias classes de cabines de segurança biológica. A Tabela 7 mostra as principais cabines, o tipo de proteção que elas oferecem e em que nível de laboratório é mais apropriado o seu uso.

A luz ultravioleta (UV) é considerada um item dispensável, mas algumas cabines de segurança a possuem instalada e é utilizada para descontaminar a superfície de trabalho interna da cabine. Deve-se dar atenção especial à manutenção dessa lâmpada; é necessário realizar limpeza semanal para que sujidade e poeira não bloqueiem a atividade germicida. Controle de utilização da luz deve ser estabelecido porque o poder de descontaminação vai decrescendo conforme a utilização. Não expor os olhos e a pele à luz UV.

Tabela 7 Tipos de cabine de segurança biológica utilizados em laboratórios

| Classe e tipo | Característica | Nível de biossegurança | Proteção |
|------------------|---|------------------------|---|
| Classe I | Cabine em que o fluxo de ar ocorre de fora para dentro, pela abertura frontal, sobre a superfície de trabalho. Os aerossóis eventualmente gerados pela manipulação do material são carregados pelo fluxo de ar para o duto de exaustão. No final do duto de exaustão existe um filtro HEPA e o ar é liberado para o interior do laboratório | 2 e 3 | Operador, ambiente Não a amostra |
| Classe II tipo A | Cabine com abertura frontal; 70% do ar é recirculado para o interior da cabine passando por um filtro HEPA; 30% é exaurido para a área do laboratório por meio de outro filtro HEPA | 2 e 3 | Operador, ambiente e amostra |
| Classe II B1 | 30% de recirculação do ar; 70% é exaurido passando por um filtro HEPA e dutada para o exterior do laboratório | 2 e 3 | Operador, ambiente e amostra |
| Classe II B2 | 100% de exaustão, sem recirculação do ar, e dutada para o exterior do laboratório | 3 | Operador, ambiente e amostra |
| Classe II B3 | Igual à classe II A, só que dutada para o exterior do laboratório | 3 | Operador, ambiente e amostra |
| Classe III | Cabine hermeticamente fechada, impermeável a gases; todo o trabalho é realizado com luvas de borracha que estão presas à câmara. O ar que entra por um filtro HEPA e o ar que sai pelo exaustor passam por dois filtros HEPA dispostos sequencialmente. Todos os equipamentos necessários (centrífuga, incubadora, etc.) devem estar dentro da cabine | 4 | Alta proteção ao operador, ambiente e amostra |

RESÍDUOS

O laboratório gera uma quantidade importante de resíduos potencialmente infectantes, e uma norma importante de biossegurança refere-se à forma de descarte desses resíduos. A RDC 306/4 descreve as normas que devem ser seguidas, sendo de suma importância que o laboratório de microbiologia tenha acesso e conhecimento dessa resolução.

Os resíduos na área da saúde são classificados em quatro grupos de A a E (Tabela 8), sendo que os resíduos infectantes gerados na microbiologia são do grupo A e E. A mesma norma orienta a forma de tratamento desses resíduos, o que está exposto na Tabela 9.

Tabela 8 Resumo da classificação dos resíduos que podem ser gerados no laboratório de microbiologia, segundo a RDC n. 306/2004

| Grupo | Simbologia | Característica | Subgrupo | Descrição resumida com foco na microbiologia |
|-------|---|---|----------|---|
| A |  | Presença de possíveis agentes biológicos que podem apresentar risco de infecção | A1 | Micro-organismos em culturas, instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; produtos utilizados na atenção de pacientes; sobras de material biológico enviados ao laboratório para análise |
| | | | A4 | Sobras de amostras de laboratório (fezes, urina e secreções) de pacientes sem agentes classe de risco 4; peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de confirmação diagnóstica |
| | | | A5 | Órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos, com suspeita ou certeza de contaminação com príons |

(continua)

Tabela 8 Resumo da classificação dos resíduos que podem ser gerados no laboratório de microbiologia segundo a RDC n. 306/2004 (continuação)

| Grupo | Simbologia | Característica | Descrição resumida com foco na microbiologia |
|-------|--|---|---|
| B |  | Químicos que apresentam risco à saúde ou ao meio ambiente | Produtos classificados como corrosivos, tóxicos inflamáveis e reativos |
| C |  | Rejeitos radioativos | Qualquer material resultante do uso de radionucleotídeos em quantidades superiores aos limites previstos pelo CNEN para reutilização ou descarte comum |
| D |  | Comum | Papel de sanitário, fraldas, absorventes higiênicos, resto de alimentos de pacientes, material utilizado na antisepsia; resíduos do administrativo; resíduos da área de construção. Neste grupo, estão localizados os materiais que podem ser reciclados (vidro, papel, metal e plástico) |
| E |  | Materiais perfurocortantes | Lâminas de barbear, agulhas, lâminas de bisturi, ampolas de vidro, lancetas, vidros de laboratório quebrados, micropipetas, entre outros |

Tabela 9 Citação da RDC n. 306 sobre o descarte de resíduos na microbiologia

5 – Grupo A1

5.1 – “culturas e estoques de micro-organismos resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética. Estes resíduos não podem deixar a unidade geradora sem tratamento prévio.” (RDC n. 306, de 7 de dezembro de 2004)

(continua)

Tabela 9 Citação da RDC n. 306 sobre o descarte de resíduos na microbiologia (continuação)

14 – Grupo E

14.7.1 – “Os resíduos perfurocortantes contaminados com agente biológico Classe de Risco 4, micro-organismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido, devem ser submetidos a tratamento, utilizando-se processo físico ou outros processos que vierem a ser validados para a obtenção de redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de Inativação Microbiana (Apêndice IV).” (RDC n. 306, de 7 de dezembro de 2004)

O tratamento prévio mais adequado para a redução da carga microbiana, no caso do laboratório de microbiologia, é a autoclavação. Os materiais contaminados devem ser postos em sacos próprios para autoclave com a identificação de infectante e colocados dentro de recipientes à prova de vazamentos. Após a autoclavação, o material deve ser colocado em recipientes adequados para coleta, conforme as normas locais.

É muito importante monitorar semanalmente o funcionamento da autoclave com indicadores biológicos que contêm *Bacillus stearothermophilus*. Esses indicadores devem ser colocados no centro da autoclave, preferencialmente dentro de um saco que está sendo autoclavado. Os ciclos que garantem a correta esterilização são: 3 minutos a 134°C, ou 10 minutos a 126°C, ou 15 minutos a 121°C, ou 25 minutos a 115°C, sendo que o ciclo rotineiramente empregado é o de 15 minutos a 121°C.

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

Armazenamento de amostras no laboratório

É uma prática comum armazenar amostras clínicas que já foram manipuladas no laboratório, para o caso de haver a necessidade de repetir algum teste. As amostras devem ser acondicionadas em caixas plásticas, preferencialmente com tampa e devidamente fechadas, com a correta identificação, indicando que são amostras clínicas já manipuladas. Podem ser armazenadas sob refrigeração.

TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

O transporte das amostras clínicas deve ocorrer de acordo com as normas de segurança apropriadas. O laboratório deve descrever a forma em que as amostras devem ser transportadas até o laboratório de microbiologia e é responsável por orientar os prestadores de serviço ou os colaboradores do laboratório que realizam tal atividade. O cumprimento das normas tem como objetivo reduzir a probabilidade de danos à amostra, como vazamentos, reduzir exposição resultando em possíveis infecções e melhorar a eficiência da entrega.

Algumas recomendações que devem constar do documento de transporte de amostras biológicas e devem ser transmitidas aos responsáveis por essa atividade são:

- O acondicionamento das amostras deve suportar manipulações bruscas e conter o material líquido sem que ocorra vazamento.
- As embalagens devem ser rotuladas de forma adequada com o símbolo de “risco biológico” e outro rótulo que alerte sobre o conteúdo perigoso da embalagem.
- A documentação sobre o conteúdo da embalagem deve conter informações necessárias para o caso de situação de emergência.
- Verificar se os frascos estão bem vedados.
- Utilizar maletas ou caixas rígidas higienizáveis.

PROCEDIMENTO EM CASOS DE ACIDENTE COM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Derramamento de material biológico

No caso de derramamento de uma amostra biológica ainda não manipulada na qual não se sabe que tipo de risco ela pode apresentar ou no caso de meio de cultura contendo micro-organismos crescidos, deve-se isolar a área e não entrar no local por pelo menos 30 minutos, para permitir que os aerossóis eventualmente gerados possam decair. Utilizando luvas e jaleco, entrar na área e colocar sobre o local do derramamento papel absorvente (p.ex., papel-toalha) e sobre o papel colocar hipoclorito de sódio a 0,5 a 1% (geralmente a água sanitária comercial apresenta 2% de cloro livre) e deixar agir por 10 minutos.

Remover o papel e descartar em saco de autoclave. Fazer uma nova descontaminação da área com hipoclorito de sódio a 0,5 a 1% e depois com álcool. Todo material utilizado na limpeza deve ser descartado no saco de autoclave.

QUEBRA DE FRASCOS DE CULTURA COM MICRO-ORGANISMOS

No caso de quebra de um frasco contendo meio de cultura com micro-organismos crescidos, isolar a área e não entrar no local por pelo menos 30 minutos, para permitir que os aerossóis eventualmente gerados possam decair. Utilizando luvas e jaleco, entrar na área e colocar sobre o local do derramamento papel absorvente (p.ex., papel-toalha) e sobre o papel colocar hipoclorito de sódio a 0,5 a 1% e deixar agir por 10 minutos. Remover os resíduos e o papel e descartá-los em caixa apropriada (perfurocortante). Fazer uma nova descontaminação da área com hipoclorito de sódio a 0,5 a 1% e depois com álcool. O material utilizado na limpeza deve ser descartado no saco de autoclave, inclusive as luvas.

ACIDENTE DENTRO DA CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Deixar a cabine de segurança biológica ligada a fim de conter os aerossóis. Colocar papel absorvente sobre a área do acidente e aplicar um desinfetante apropriado. Se houver espirros nas paredes da cabine, desinfetar com papel absorvente embebido na solução desinfetante. Deixar agir durante pelo menos 30 minutos com a cabine ligada. Se houver necessidade de retirar a superfície de trabalho para fazer a limpeza da parte de baixo, realizar essa ação após essa primeira limpeza e sempre colocar papel-toalha sobre o material derramado antes de proceder à limpeza.

BIOSSEGURANÇA COM MICOBACTÉRIAS

As medidas de biossegurança mais adequadas para um laboratório que manipula amostras para detecção de micobactérias depende das atividades realizadas. A Tabela 10 associa as atividades realizadas no laboratório com o nível de risco para os colaboradores. Considerando-se as atividades realizadas no laboratório e o nível de risco que apresentam, determinam-se os EPI e EPC a serem utilizados.

Tabela 10 Nível de risco associado à atividade realizada no laboratório, EPI e EPC recomendados

| Nível de risco | Atividade do laboratório | Avaliação do risco | EPI/EPC recomendados |
|----------------|---|--|---|
| Baixo | Preparo da lâmina, coloração pelo método de Ziehl e microscopia de amostra de escarro. Preparo da amostra para amplificação de ácido nucleico | Baixo risco de a amostra gerar aerossol; baixa concentração de partículas infecciosas | Respirador, cabine de segurança, jaleco, luvas, óculos |
| Moderado | Processamento e concentração da amostra para inoculação em meios de cultura primários e teste direto na amostra de sensibilidade a drogas | Risco moderado de a amostra gerar aerossol; baixa concentração de partículas infecciosas | Todos os anteriores e centrífuga refrigerada com capota protegida; sala reservada |
| Alto | Manipulação de cultura para identificação. Teste de sensibilidade a drogas em isolados de cultura | Alto risco de a amostra gerar aerossóis; alta concentração de partículas infecciosas | Todos os itens anteriores e sala separada com sistema de ventilação apropriado e pressão negativa |

EPI: equipamento de proteção individual; EPC: equipamento de proteção coletiva.

Em uma avaliação do risco de colaboradores adquirirem tuberculose, devem-se considerar também as boas práticas para manipulação das amostras, o que irá gerar consideravelmente menos aerossóis, assim como menor volume de trabalho do laboratório. As avaliações de risco requerem um julgamento cuidadoso; não se devem subestimar nem supervalorizar os riscos, o que pode ocasionar encargos tanto financeiros como em recursos humanos.

BIBLIOGRAFIA

1. Anvisa. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília, 2013.
2. Arboledas JCA, Pedrosa EGG, León JL, Sáenz JLP, Molinero EL. 10ª. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. 2014.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde.
5. CLSI. Clinical Laboratory Safety; 3rd ed. Approved Guideline. GP17-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
6. CLSI. Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections. 3.ed. Approved Guideline. M29-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
7. Fleming DO, Hunt DL. Laboratory safety – Principles and practices. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2006.
8. Mastroianni MF. Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. São Paulo: Atheneu, 2004.
9. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos básicos em microbiologia Clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
10. WHO. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3.ed. 2004.
11. WHO. World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual. 2012.

3. Rotinas em microbiologia

3.1. Urocultura

AS INFECÇÕES DO trato urinário (ITU) constituem um dos quadros mais frequentes entre as infecções humanas e compreendem várias síndromes, caracterizadas pela presença de micro-organismos no trato urinário e por serem frequentemente acompanhadas de resposta inflamatória aguda e sintomática. As síndromes mais frequentes incluem: cistite, pielonefrite e bacteriúria assintomática. A cistite é definida como a infecção da bexiga e caracteriza-se por sintomas como disúria, estrangúria e polaciúria. Na pielonefrite, a infecção envolve os rins e a pelve renal e é geralmente associada a sintomas sistêmicos, como a febre. A bacteriúria assintomática é definida como a presença de bactérias na urina na ausência de sintomas. Tem maior significado clínico em gestantes, indivíduos em uso de dispositivos ou submetidos a procedimentos invasivos no trato urinário e crianças com refluxo vesicouretral.

Os principais agentes das ITU são geralmente limitados aos componentes da própria microbiota intestinal do paciente. Entre os bacilos Gram-negativos, a maioria é causada por *Escherichia coli* e, em menor frequência, por *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa*. Este último patógeno é usualmente detectado em pacientes submetidos a procedimentos invasivos ou hospitalizados. Entre os micro-organismos Gram-positivos, destacam-se, em relação à frequência, *Enterococcus* spp e *Staphylococcus saprophyticus*. Sua frequência é variável em infecções em pacientes ambulatoriais ou hospitalizados. Em mulheres, *E. coli* é responsável pela maioria dos casos de ITU não complicadas, seguido pelo *S. saprophyticus*. Em pacientes hospitalizados, *E. coli* também predomina, mas outros bacilos Gram-negativos

se destacam (*Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Klebsiella* spp, *Providencia* spp, *Pseudomonas* spp e *Acinetobacter* spp). Entre os Gram-positivos, destaca-se *Enterococcus* spp. Em alguns grupos específicos de pacientes, micro-organismos incomuns podem ter significado. ITU por *Corynebacterium urealyticum* está usualmente associada a cistite e pielite em crianças e adultos com litíase urinária e eventualmente em receptores de transplante renal. *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* beta-hemolítico do grupo B) deve ser pesquisado em urina de gestantes. As ITU são, na sua maioria, causadas por um único agente e, em algumas situações, uroculturas com até dois micro-organismos podem ser relevante.

Estima-se que aproximadamente 10% da população feminina tenha pelo menos um episódio de ITU ao longo da vida e a cultura de urina é considerada o método laboratorial de referência para o diagnóstico. A urocultura é uma técnica quantitativa e, tradicionalmente, o diagnóstico é baseado no número de unidades formadoras de colônias/mL de urina (UFC/mL). É o exame mais solicitado em laboratório de microbiologia clínica. O maior desafio para se obter resultados de urocultura fidedignos está na fase pré-analítica. A qualidade dos resultados da urocultura é influenciada pela orientação correta sobre os procedimentos de coleta e transporte fornecidos ao paciente ou profissional que irá realizar a coleta. A coleta deve ser feita de modo a evitar ao máximo a contaminação com a microbiota uretral e perineal. Mesmo quando a coleta é considerada adequada, os índices de contaminação podem variar de 7 a 31%.

MÉTODOS DE COLETA DE URINA

Segundo jato de urina, urina jato médio ou meio de jato da primeira urina da manhã

Este é o método de coleta de urina mais usual, especialmente em pacientes ambulatoriais, e é passível de contaminação com a microbiota genital. A correta instrução ao paciente para a coleta tem relação direta com a diminuição nos índices de contaminação.

O ideal é que o paciente realize a coleta no próprio laboratório, e não em casa, visando a eliminar o viés gerado pelo aumento da contagem de colônias durante o transporte. Vale lembrar que uma enterobactéria duplica-se, em média, a cada 20 minutos e o transporte em temperatura inadequada pode alterar significativamente a contagem bacteriana, levando a culturas falso-positivas.

- Sexo feminino: antes de iniciar a coleta, a paciente deve lavar as mãos. Em pacientes ambulatoriais, o ideal é que a paciente realize sua higiene genital com água e sabonete comum e a seguir seque a região genital com toalha limpa em sua residência antes de se dirigir ao laboratório. Fazer a higiene genital com gaze embebida preferencialmente com água e sabonete neutro e com movimentos de frente para trás. Retirar o excesso com gaze seca. Idealmente, a higienização deve ser feita 3 vezes consecutivas. Alternativamente, utilizar solução aquosa de clorexidina ou lenços para higiene, comercialmente disponíveis. Afastar os grandes lábios. Desprezar o primeiro jato e coletar a porção média da urina sem interrupção do fluxo em frasco estéril de boca larga. Desprezar a porção final da urina no vaso sanitário.
- Sexo masculino: lavar as mãos e fazer a higiene da região genital. Embeber gaze, preferencialmente com água e sabonete neutro. Retirar o excesso com gaze seca. Em homens não circuncidados, afastar o prepúcio, desprezar o primeiro jato e coletar a porção média da urina sem interrupção do fluxo em frasco estéril de boca larga. Desprezar a porção final da urina no vaso sanitário. Deve-se ter especial atenção para não tocar no interior do frasco e não o encostar na pele.

Nota 1: os laboratórios que dispõem de infraestrutura adequada podem recomendar a coleta em suas dependências e, dessa forma, evitar as variáveis de coleta e transporte que podem interferir na qualidade do exame.

Nota 2: idealmente, a urina de jato médio deve ser preferencialmente a da primeira urina da manhã. Existem variações em relação às recomendações dos documentos normativos sobre o tempo de retenção da urina para a realização de uroculturas. A retenção por pelo menos 4 horas diminui o número de resultados falso-negativos.

Nota 3: também é importante não estimular a ingestão de líquidos, uma vez que pode haver diluição da urina e diminuição proporcional da quantidade de bactérias na amostra.

Urina coletada com cateter

Indicada em situações em que o paciente está incapacitado para coletar a urina em razão, por exemplo, de complicações neurológicas ou urológicas. Mesmo sob rígidos procedimentos de assepsia, existe o risco de introdução de bactérias na bexiga e, em alguns casos, a indução da infecção; portanto, é um método que deve ser executado exclusivamente sob indicação médica.

Há duas possibilidades quanto ao cateterismo. A primeira é a sondagem vesical de alívio, indicada para confirmação de resultado ou em pacientes sabidamente com limitações na micção espontânea. O cateterismo vesical é um procedimento realizado exclusivamente por enfermeiro ou médico, sob rigorosa técnica de assepsia. Na sondagem vesical de alívio, deve ser feita antisepsia com solução aquosa de clorexidina e a seguir é introduzida sonda vesical compatível com o diâmetro da uretra. A amostra deve ser coletada em frasco estéril descartável.

Em pacientes com sondagem vesical de demora, deve-se pinçar a cânula do coletor e aguardar pelo menos 1 hora, de modo a haver volume de urina suficiente na bexiga. Esse procedimento é necessário para realizar o exame de urina tipo 1, sumário ou EAS na mesma amostra. Realizar antisepsia com etanol ou isopropanol a 70%. Segurando a sonda com a pinça e utilizando seringa e agulhas estéreis, coletar de 5 a 10 mL de urina e transferir para um frasco estéril. Deve-se tomar cuidado para não puncionar o canal de preenchimento do balão intravesical. Não coletar urina diretamente da bolsa coletora, a não ser que seja trocada imediatamente antes da coleta. Recomenda-se que a coleta seja feita em até 72 horas após a colocação ou troca do cateter. Caso esse tempo não possa ser seguido, recomenda-se, sempre que possível, a troca do cateter antes da coleta.

Urina coletada por punção suprapúbica

Este método é considerado de referência, pois a urina é obtida diretamente da bexiga, evitando a contaminação com a microbiota genital; entretanto, destina-se a situações específicas, para esclarecimentos de casos suspeitos de ITU cujos resultados da urocultura com urinas coletadas por métodos não invasivos foram inconclusivos (especialmente em crianças) e para cultura para germes anaeróbios.

É um procedimento realizado exclusivamente por enfermeiro ou médico sob rigorosas condições de assepsia. A bexiga deve estar cheia e palpável antes da aspiração. A coleta é realizada por punção diretamente da bexiga com agulha e seringa estéreis após desinfecção da pele com clorexidina alcoólica. Após a coleta, a amostra é transferida para um frasco estéril.

Urina coletada com saco coletor (autoaderente)

É um procedimento indicado para crianças sem controle esfinteriano. O controle esfinteriano é alcançado aos 2 anos por algumas crianças e aos 3 anos

pela maioria absoluta delas. É o método que fornece os maiores índices de resultados falso-positivos. A taxa de contaminação é alta, especialmente em meninos não circuncidados.

Deve-se recomendar aos pais ou cuidadores que deem banho na criança e removam completamente qualquer resíduo de pomadas ou cremes. Colocar fralda, mas sem utilizar cremes ou pomadas na genitália.

No laboratório, fazer a higiene prévia da região genital e anal com gaze embebida em água morna e sabonete neutro. Retirar o excesso com gaze seca. Alguns laboratórios utilizam a clorexidina aquosa após a limpeza prévia com água e sabão. Fixar o coletor assepticamente de forma que a uretra fique coberta por ele. Trocar o saco coletor a cada 30 minutos e repetir a higiene a cada troca. Após a coleta, fechar o saco coletor. Não transferir para outros recipientes.

Nota 1: quando é solicitada a coleta de sangue e de urina, alguns laboratórios optam por colocar o saco coletor e posteriormente proceder à coleta do sangue, uma vez que o estresse do procedimento da coleta de sangue favorece a eliminação da urina.

TRANSPORTE

As amostras devem ser transportadas em até 2 horas em temperatura ambiente (20 a 25°C) ou sob refrigeração (2 a 8°C) em até 24 horas. Alguns laboratórios optam por exigir o transporte exclusivamente sob refrigeração, em função das elevadas temperaturas observadas na maioria das regiões do Brasil. Esse tempo corresponde ao período transcorrido entre a coleta e a entrega para processamento no laboratório. A urina não deve ser congelada.

Quando a refrigeração não for possível, recomenda-se o uso de conservantes bacteriostáticos. Existem disponíveis no mercado sistemas com conservantes, especialmente o ácido bórico, que mantêm o pH em torno de 6,0 e preservam a contagem de colônias próxima à contagem real, por 24 a 48 horas, diminuindo as chances de culturas falso-positivas.

Outra opção, dependendo das características do laboratório, é iniciar o processamento da urina nas unidades de atendimento e encaminhar os meios já semeados para a central técnica.

O envio das amostras de urina ao laboratório de apoio/matriz deve ser feito em tempo hábil, em recipientes contendo gelo reciclável e temperatura controlada. As amostras devem ser acondicionadas de modo a não ficarem soltas no

recipiente de transporte. O acondicionamento deve obedecer rigorosamente às normas de biossegurança vigentes no país.

VOLUME

Como regra geral, quanto maior o volume, melhor a qualidade do exame bacteriológico. Um volume mínimo de 0,1 mL é suficiente para a realização da urocultura; entretanto, é importante lembrar que, na maioria absoluta das vezes, o médico solicita também o exame de urina tipo I, sumário ou EAS na mesma amostra. Nesse caso, o volume ideal é de 12 mL e o mínimo é de 5 mL para a maioria dos laboratórios clínicos. No caso de urinas coletadas com conservantes, recomendam-se volumes acima de 3 mL. A Tabela 1 resume as condições de encaminhamento das amostras para uroculturas.

Tabela 1 Sugestões sobre as condições de encaminhamento e estabilidade das amostras para urocultura

| Tipo de material usado na coleta | Volume mínimo recomendado | Condições de encaminhamento ao laboratório | Temperatura de transporte | Condições de viabilidade da amostra para eventual processamento posterior |
|---|---------------------------|--|---------------------------|---|
| Frascos estéreis | 0,1 mL | Inferior a 30 minutos em temperatura ambiente Até 24 horas sob refrigeração | Sob refrigeração | Até 24 horas sob refrigeração |
| Recipientes de transporte com conservante | 3 mL | Inferior a 24 horas em temperatura ambiente | Temperatura ambiente | Inferior a 24 horas em temperatura ambiente |
| Meios de cultura semeados | Não se aplica | Inferior a 6 horas em temperatura ambiente | Temperatura ambiente | Inferior a 24 horas em temperatura ambiente |

CADASTRO

Além das informações gerais para o cadastro do paciente/cliente, de acordo com os procedimentos de gestão de qualidade do laboratório, especificamente para a realização da urocultura, as informações listadas a seguir devem, obrigatoriamente, ser cadastradas: horário da coleta, horário do recebimento, tipo de amostra e exames solicitados. Idealmente devem constar também a indicação clínica e o uso de antimicrobianos.

CRITÉRIOS DE REJEIÇÃO

Cada laboratório deve estabelecer os critérios a serem seguidos para a rejeição das amostras. Para urocultura, são inadequadas:

- Urina coletada em recipientes não estéreis.
- Urina sem refrigeração com período superior a 2 horas após a coleta.
- Urina com volume inferior ao mínimo aceitável.
- Urina de 24 horas.
- Urina coletada da bolsa de pacientes com sondagem vesical de demora.
- Urina em recipiente com vazamento, quebrado e/ou sem identificação.
- Pontas de sonda vesical (cateter de Foley).

Nota 1: antes de rejeitar as amostras de urina coletadas por procedimentos invasivos, consultar o médico-assistente e o responsável pelo setor de microbiologia.

Nota 2: em situações em que a urina será processada mesmo em condições inadequadas, deve ser incluída no laudo uma observação sobre as condições que possam ter comprometido a qualidade do resultado.

PROCESSAMENTO

A definição de um método-padrão para o processamento de urocultura que seja utilizado por todos os laboratórios de microbiologia não existe. O volume de urina a ser usado, o método de coleta da urina, o meio de cultura, o tempo de incubação e os critérios de interpretação são variáveis relacionadas a características do laboratório e da população de pacientes assistidos: origem (ambulatoriais, internados ou ambos), idade, sexo, doença de base, transplantados, entre outros.

Cada laboratório deve estabelecer seu próprio guia para o processamento e interpretação de uroculturas, respeitando alguns princípios básicos. A seguir, são apresentadas algumas recomendações baseadas na literatura.

A cultura de urina deve ser realizada por metodologia quantitativa, em que é estimado o número de unidades formadoras de colônias/mL de urina (UFC/mL), a partir de amostra não centrifugada. Recomenda-se que o cultivo realizado com urinas coletadas por procedimentos não invasivos detecte de 10^4 a 10^5 UFC/mL. Para urinas coletadas por procedimentos invasivos, o limite de detecção é de 10^2 UFC/mL, quando utilizada a alça de $10 \mu\text{L}$ (Tabela 2). O procedimento é usualmente feito com alças calibradas, estéreis e descartáveis. O volume recomendado é dependente do tipo de amostra de urina e do limite de detecção desejável. Idealmente, a requisição deve especificar a necessidade de detecção de contagens com limites baixos, porém, como isso é raro, o laboratório pode instituir as situações em que esse limite é considerado significativo para determinados patógenos (p.ex., pacientes transplantados, pacientes urológicos).

Tabela 2 Volume recomendado para a urocultura de acordo com o tipo de amostra de urina

| Método | Volume |
|---|------------------|
| Métodos não invasivos: urinas de meio de jato | $1 \mu\text{L}$ |
| Urina coletada com cateter em pacientes adultos | $1 \mu\text{L}$ |
| Urina coletada com cateter em pacientes pediátricos | $1 \mu\text{L}$ |
| Urina coletada por punção suprapúbica | $10 \mu\text{L}$ |
| Urinas de pacientes transplantados | $10 \mu\text{L}$ |

MEIO DE CULTURA

Há várias opções de meios para urocultura. Classicamente, os meios recomendados são o ágar sangue e um meio seletivo para bacilos Gram-negativos. Embora possa ser usado o ágar MacConkey (MAC) ou eosina azul de metileno (EMB), visando a otimizar custos, o ágar *cystine lactose electrolyte deficient* (CLED) é o meio classicamente usado na maioria dos laboratórios brasileiros, pois permite o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O meio seletivo ágar colistina ácido nalidíxico (CNA) é recomendado para detecção de bactérias Gram-positivas.

Os meios com substratos cromogênicos têm sido amplamente utilizados para urocultura. Têm como vantagem a identificação presuntiva dos principais gêneros e espécies associados à ITU, além de caracterizar mais facilmente culturas polimicrobianas, reduzindo o número de identificações desnecessárias.

rias. Entre eles, podem ser citados: CHROMagar® Orientation (BD Diagnostics) e CPS® ID3 (bioMérieux).

INCUBAÇÃO

O tempo de incubação mínimo para a liberação de um resultado negativo é de 24 horas; entretanto, recomenda-se a incubação por até 48 horas no caso particular de urinas coletadas por procedimentos invasivos e de urinas com pedidos específicos ou de grupos de pacientes em que a ITU está relacionada a micro-organismos fastidiosos (p.ex., *Corynebacterium urealyticum*).

Nota 1: opcionalmente, pode-se utilizar o laminocultivo. Após homogeneização da urina, um pequeno volume é depositado na superfície dos meios. A maioria das lâminas comercialmente disponíveis contém os meios ágar CLED e MAC. Tem como vantagem a facilidade de semeadura e como desvantagem a dificuldade na avaliação do número de colônias e detecção de culturas mistas.

Nota 2: todos os métodos de cultura devem ser capazes de detectar os patógenos mais frequentes em ITU: *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus agalactiae*.

PÓS-ANALÍTICO

Interpretação das culturas

A bacteriúria ainda hoje é considerada o marcador definitivo de ITU. Em estudo conduzido na década de 1950, a contagem de 10^5 UFC/mL de bacilos Gram-negativos em cultura pura de urina de meio de jato em mulheres sintomáticas era indicativo de ITU. Entretanto, estudos posteriores mostraram que esse limite poderia levar a resultados falso-negativos em pacientes com ITU e cujas contagens estão entre 10^2 e 10^4 UFC/mL. Contagens de 10^2 UFC/mL estão associadas a ITU em até 50% das mulheres com quadro de cistite quando a coleta é realizada no início da sintomatologia. No sexo masculino, o limite de 10^3 é considerado ITU. Para o diagnóstico de ITU, devem ser levados em consideração a contagem de colônias, o método de coleta da amostra e dados demográficos e clínicos (sexo, idade, presença ou ausência de sintomas, fatores predisponentes, população de risco, entre outros).

A correlação dos dados do sedimento urinário com a urocultura é útil para a interpretação diagnóstica e para a tomada de decisões terapêuticas. Um número elevado de leucócitos na urina (piúria) está presente na maioria dos pacientes com quadros de uretrite, cistite e pielonefrite; entretanto, em al-

guns pacientes com bacteriúria, a contagem de leucócitos pode se apresentar normal.

É fundamental também levar em consideração na análise o tipo de paciente e o método de coleta da urina. A interpretação dos resultados de urocultura difere entre laboratórios, e procedimentos bem estabelecidos devem ser determinados e usados. Também é fundamental que esses critérios sejam comunicados ao corpo clínico. Na Tabela 3, estão descritas sugestões sobre critérios de interpretação de acordo com o tipo de urina.

Tabela 3 Interpretação da urocultura de acordo com o método de coleta de urina

| Tipo de urina | Micro-organismos | UFC/mL | Procedimento |
|--|------------------|--|---|
| Não invasivos: meio de jato, saco coletor | 1 | Menor que 10^4 | ID |
| | | $\geq 10^4$ com sintomas | ID + TSA |
| | | $\geq 10^5$ sem sintomas | ID + TSA |
| | | $\geq 10^3$ de uropatógenos em mulheres (14 a 30 anos) e homens sintomáticos | ID + TSA |
| | 2 | Ambos menor que 10^5 | ID |
| | | Ambos $\geq 10^5$ | ID + TSA de ambos |
| | | $1 < 10^5$ e $1 \geq 10^5$ | ID do $< 10^5$ |
| | | | ID + TSA do $\geq 10^5$ |
| | ≥ 3 | $1 \geq 10^5$ | ID e TSA do isolado com contagem $\geq 10^5$ e ID dos outros dois |
| | | $2 < 10^4$ | Reportar múltiplos micro-organismos e solicitar nova amostra |
| | | Qualquer outro achado | |
| Invasivos: sondagem vesical de alívio | | $\geq 10^2$ | ID + TSA |

(continua)

Tabela 3 Interpretação da urocultura de acordo com o método de coleta de urina (continuação)

| Tipo de urina | Micro-organismos | UFC/mL | Procedimento |
|--|------------------|--|---|
| Invasivos: sondagem vesical de alívio | | $2 \geq 10^2$ | ID + TSA de ambos |
| | | $1 < 10^2$ e $1 \geq 10^2$ | ID do $< 10^2$ |
| | ≥ 3 | $1 \geq 10^4$ $2 < 10^4$ Qualquer outro achado | ID + TSA do $\geq 10^2$ ID e TSA do isolado com contagem $\geq 10^4$ e ID dos outros dois Reportar múltiplos micro- organismos e solicitar nova amostra |
| Punção suprapúbica | 1 ou 2 | Qualquer contagem | ID + TSA |
| | 3 | Qualquer contagem | ID + TSA ou entrar em contato com o clínico |

ID: identificação; TSA: teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Levando em consideração os aspectos clínicos, o sexo do paciente e o método de coleta de urina, as seguintes contagens são relevantes:

- $\geq 10^3$ UFC/mL de uropatógenos em urinas de jato médio em casos de cistite não complicada em mulheres.
- $\geq 10^4$ UFC/mL de uropatógenos em urinas de jato médio em casos de pielonefrite não complicada em mulheres.
- 10^5 UFC/mL de uropatógenos em urinas de jato médio em mulheres ou $> 10^4$ UFC/mL de uropatógenos em homens ou em mulheres com cateter urinário em UTI complicadas.
- Bacteriúria assintomática em mulheres é diagnosticada quando em, duas culturas consecutivas (idealmente com intervalos de 24 horas ou a critério do médico solicitante), ocorre o isolamento do mesmo micro-organismo em contagens $> 10^5$ UFC/mL.
- Bacteriúria assintomática em homens é definida pela presença de um único uropatógeno em contagens $> 10^5$ UFC/mL em uma amostra de urina de jato médio.

- Bacteriúria assintomática em homens e mulheres é definida pela presença de um único uropatógeno em contagens $> 10^2$ UFC/mL em amostra de urina coletada com cateter.

Nota 1: *S. aureus* é um agente raro de ITU. Em pacientes febris, a sua detecção deve disparar investigação de endocardite à direita, usualmente por uso de cateter venoso central.

Nota 2: *P. aeruginosa* em amostra de criança sem controle esfinteriano deve ser discutida com o clínico, pois usualmente representa colonização vaginal.

O diagnóstico de ITU em alguns grupos de pacientes é um desafio. Os pacientes idosos estão entre os grupos com maior suscetibilidade em adquirir ITU e que se apresentam de maneira atípica. Os sintomas clássicos de ITU estão alterados ou ausentes nos pacientes mais idosos ou naqueles em uso de cateter vesical de demora. Na maioria das vezes, a bacteriúria é assintomática e com mais de um micro-organismo. Segundo consenso publicado pela Infectious Diseases Society of America (IDSA), não é recomendada a realização de uroculturas para triagem e tratamento de bacteriúria assintomática em idosos institucionalizados ou não. Alguns clínicos confundem a presença de leucocitúria com o fato de uma infecção ser sintomática ou não. Leucocitúria é um sinal, e não um sintoma. Há pacientes completamente assintomáticos com leucocitúria significativa. Em crianças, o diagnóstico é dificultado especialmente nos casos de urinas coletadas com saco coletor. Recentemente foi publicado um consenso da Academia Americana de Pediatria sobre critérios para o diagnóstico e manejo de ITU em crianças de 2 meses a 2 anos, com febre de origem a esclarecer. Foi estabelecido que o diagnóstico de ITU requer a associação de dados de urinálise (piúria e/ou bacteriúria) e a presença de pelo menos 50.000 UFC/mL de um único uropatógeno em urina coletada com cateter ou punção suprapúbica. No Brasil, os pediatras optam por uma conduta menos invasiva e utilizam as amostras de urina coletadas com saco coletor como triagem. Essa conduta vem do fato de que amostras coletadas por esse método, quando sem piúria ou quando a cultura é negativa, têm elevado valor preditivo negativo. As coletas com sondagem de alívio são reservadas para os quadros graves ou para confirmação diagnóstica.

Como reportar os resultados

O laudo da urocultura deve conter o tipo de amostra coletada (urina de jato médio, punção, saco coletor, urina coletada com sonda), a identificação bacte-

riana e as respectivas contagens em UFC/mL. Sugestões de formatos de resultados são apresentadas a seguir:

Culturas negativas

- a. Se nenhum micro-organismo foi observado nos meios usados, reportar: negativo ou sem crescimento de uropatógenos ou não houve crescimento de micro-organismos na amostra analisada.
- b. Se foi semeado o inóculo de 1 µL, reportar: negativa. Ausência de crescimento de uropatógenos em contagem $\geq 10^3$ UFC/mL.

Nota: se o laboratório opta por utilizar alças calibradas de 1 µL, o resultado reportado como “negativo” em mulheres sintomáticas deve ser interpretado com cautela.

Culturas positivas

- a. Reportar a identificação e as UFC/mL de cada patógeno separadamente.
- b. Com três ou mais micro-organismos: reportar múltiplos micro-organismos sugestivos de contaminação durante a coleta **ou** reportar a UFC/mL de cada micro-organismo sem ID **ou** reportar a UFC/mL de cada micro-organismo e a ID presuntiva. Em todos os casos, deve ser incluída a observação: “Sugere-se nova amostra, a critério do médico-assistente”.

BIBLIOGRAFIA

1. Anvisa. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde – Módulo 4 Cap.1 p. 9-95: Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica e Laudo Final. 2014.
2. Clinical Laboratory Standard Methods (CLSI). Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine, specimens; Approved Guideline. 2.ed. CLSI GP16 - A2, vol. 21, n. 19, p. 1- 36.
3. Ellen JB, Richard Jr BS. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Manual of clinical microbiology. Washington: ASM Press, 2010. p.228-71.
4. Garcia LS, Isenberg HD. Urine cultures. In: Clinical microbiology procedures handbook. v.1. 3.ed. Washington: ASM Press, 2010. p.1-27.
5. Garcia LS, Isenberg HD. Specimen collection, transport, and acceptability. In: Clinical microbiology procedures handbook. v.1. 3.ed. Washington: ASM Press, 2010. p.1-26.
6. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology. Cumitech. 2C. 2009.

7. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* 2005;40(5):643-54.
8. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
9. Subcommittee on Urinary Tract Infection, Steering Committee on Quality Improvement and Management, Roberts KB. Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months. *Pediatrics* 2011;128(3):595-610.

3.2. Hemocultura

ALTAS TAXAS DE morbidade e mortalidade são atribuídas à infecção da corrente sanguínea em crianças e adultos em todo o mundo. Assim, uma detecção rápida e com boa acurácia de casos de bacteremia e fungemia é fundamental para os devidos cuidados do paciente. Para esse fim, utiliza-se a hemocultura, considerada o melhor teste laboratorial para detecção de micro-organismos no sangue.

Sabe-se que os principais erros dos laboratórios clínicos ocorrem durante a fase pré-analítica, que compreende a requisição do exame, identificação correta do paciente e coleta, transporte e estocagem da amostra. Assim, um bom envolvimento do médico com o laboratório de microbiologia pode ser muito proveitoso para ambos. Adiciona-se, também, o treinamento adequado do profissional responsável pela coleta.

No caso de hemoculturas, o monitoramento de taxas de contaminação pelo laboratório, juntamente com o retorno dessa informação para os profissionais do laboratório, pode auxiliar o controle e a diminuição dos índices de resultados falso-positivos originados em erros executados na fase pré-analítica.

COLETA

Para que haja sucesso na coleta de hemoculturas, é necessário que certos requisitos sejam adotados e seguidos com rigor, como: materiais utilizados, horários, número total de frascos e volume de sangue. Deve existir no laboratório clínico um manual de coleta de amostras, sendo este um documento que define instruções específicas para o procedimento de coleta, de acordo com o tipo de paciente e de espécime. Tal manual também deve conter instruções de medidas

de precaução de transmissão de agentes infecciosos por instrumentos e materiais laboratoriais, além de especificar os cuidados a serem tomados em caso de exposição ao material biológico. Instituído pela direção do laboratório, o manual deve estar sempre à disposição dos responsáveis pela coleta, que devem ser orientados para consulta em caso de dúvidas, assim como para treinamento e consulta dos funcionários da recepção.

Os horários de coleta de hemocultura devem ser estabelecidos pelo médico solicitante, podendo ser realizada de hora em hora, no início da febre (o pico febril deve ser evitado) e em horário anterior à administração da medicação, de preferência.

O número de frascos coletados será definido de acordo com a condição clínica do paciente e da suspeita diagnóstica. Contudo, um total de três hemoculturas obtidas em 24 horas costuma ser suficiente para descartar casos de bacteremia ou endocardite, além de permitir discriminar casos de contaminação de uma bacteremia verdadeira. No caso de pacientes pediátricos, geralmente são suficientes duas amostras em intervalos de 2 a 3 horas. Já em pacientes adultos com sepse e/ou instáveis, a exemplo de suspeita de endocardite bacteriana aguda, a hemocultura deve ser realizada o mais breve possível, a fim de se ter conhecimento do agente etiológico e de evitar falhas na antibioticoterapia. Neste caso, é recomendada a coleta de três amostras de sangue a partir de punções venosas, em braços alternados, com intervalos de 15 a 30 minutos, 1 a 2 horas antes da antibioticoterapia. Caso haja suspeita de endocardite bacteriana subaguda, as coletas podem ser realizadas com intervalos maiores, sendo recomendado coletar três amostras nas primeiras 24 horas, com intervalos de 15 minutos até 1 hora, em punções venosas diferentes, sendo as duas primeiras, preferencialmente, antes do início da febre. Em adultos com episódio febril agudo, duas coletas, de braços alternados, com intervalo de 10 minutos antes da antibioticoterapia, geralmente são suficientes para o diagnóstico. Quando a febre no adulto é de origem desconhecida, recomendam-se duas ou três coletas diferentes, com intervalos de 1 hora ou mais em período de 24 horas.

O método de coleta de sangue, além do volume coletado, influencia diretamente no sucesso de recuperação do patógeno e interpretação correta de resultados. Dessa maneira, a coleta realizada por meio de cateteres ou cânulas não é recomendada, em virtude de maiores taxas de contaminação da hemocultura, sendo o uso de punções venosas o método mais apropriado. Punções arteriais não trazem benefícios diagnósticos quando comparadas a punções venosas e, portanto, também não são recomendadas.

O sangue humano normal contém substâncias que inibem o crescimento bacteriano e, para reduzir a concentração desses fatores de inibição, ele deve ser inoculado em frascos com meio de cultura, de modo a manter a proporção sangue:meio de cultura de 1:5 a 1:10. Dentro dessa proporção, quanto maior o volume de sangue, melhor é a recuperação do micro-organismo, visto que há correlação direta entre o volume de sangue e a quantidade de unidades formadoras de colônias por microlitro de sangue de um indivíduo adulto. Em geral, no caso de adultos, é ideal a coleta de aproximadamente 10 a 20 mL de sangue. Alguns sistemas comerciais utilizam proporções sangue:meio de cultura menores que 1:5, mas pelo fato de apresentarem substâncias que atuam se ligando e evitando a ação dos inibidores contidos no sangue. Para neonatos e crianças pequenas, o volume adequado varia de 0,5 a 3 mL, aproximadamente. Entretanto, o ideal é se levar em conta a idade do paciente, visto que o volume de sangue coletado nunca deve ser maior do que 1% do volume total de sangue do indivíduo.

O material necessário para a coleta de sangue para hemocultura compreende frascos de hemocultura, garrote, seringas e agulhas de coleta, gazes e luvas esterilizadas, álcool etílico ou isopropílico a 70% e solução de iodopovidona a 10% ou de iodo a 1%.

Para o procedimento de extração de sangue para realização de hemocultura, o responsável pela coleta deve, imediatamente antes da conduta, lavar as mãos cuidadosamente e enxugar com gaze esterilizada. Após garrotear o braço do paciente para localizar a veia a ser puncionada, deve-se realizar antisepsia com álcool a 70%, em uma área da pele de cerca de 10 cm de diâmetro ao redor do local da punção. A antisepsia é realizada a partir do centro, em movimentos circulares, a fim de minimizar a contaminação da hemocultura. Esse procedimento deve ser repetido utilizando solução de iodo a 1% ou iodopovidona a 10%, deixando a solução atuar por até 2 minutos, para em seguida ser retirada com álcool a 70%. Nos Estados Unidos, o uso de clorexidina gluconato também é empregado para esse fim em crianças acima de 2 anos de idade, entretanto o álcool a 70% é o método preferencial. Deve-se também desinfetar a tampa do frasco de hemocultura com a solução de iodo e posteriormente com álcool a 70%, deixando secar o excesso de álcool. A fim de minimizar o risco de acidente, utiliza-se a mesma agulha da coleta para injetar o sangue extraído diretamente no frasco contendo o meio de cultura. Após introdução do sangue no frasco, este deve ser agitado suavemente para misturar o meio de cultura com o material coletado.

A identificação da amostra deve ser realizada no frasco de coleta, nunca sobre rótulos ou na tampa. Para frascos de sistemas automatizados, retirar a identificação do frasco e colar na folha de requisição correspondente, deixando livre o código de barras contido na etiqueta desse recipiente. A identificação do paciente deve ser repetida pelo profissional na hora que realizar a coleta, de forma legível e correta, evitando coleta de material de pessoa diferente da cadastrada.

Os devidos cuidados devem ser tomados para não contaminar a requisição médica ou a superfície externa do frasco, o qual também deve ser verificado quanto à vedação adequada. Em caso de respingos na superfície ou contaminação externa do frasco, realizar descontaminação com álcool a 70% ou outra solução descontaminante disponível. Evitar contaminação com as áreas adjacentes, além do uso de luvas esterilizadas, são medidas indispensáveis para minimizar o crescimento de potenciais contaminantes na hemocultura. Deve-se evitar diálogo durante a coleta e toda amostra deve ser considerada como potencialmente patogênica.

TRANSPORTE

Deve existir monitoramento do transporte das amostras coletadas de modo a assegurar que sejam transportadas dentro do prazo e na temperatura adequada especificada no manual de coletas, para que haja manutenção da viabilidade do patógeno e garantia da segurança do transportador, demais indivíduos, meio ambiente e laboratório de destino, de acordo com as exigências nacionais ou locais.

O frasco de hemocultura contendo a amostra não deve ser refrigerado, visto que o resfriamento pode causar a morte de certos micro-organismos ou até mesmo levar à quebra do frasco. Após a coleta, os frascos devem ser mantidos em temperatura ambiente e encaminhados imediatamente ao laboratório. O tempo crítico para o transporte de frascos contendo amostras para hemoculturas é de 30 minutos.

CADASTRAMENTO DA AMOSTRA

Os frascos contendo as amostras e os pedidos médicos devem ter a identificação do paciente e a hora de coleta, além de informar se está em uso de antibióticos e o possível diagnóstico. Para minimizar erros na identificação da amostra, devem-se utilizar, no mínimo, duas informações por amostra (nome do paciente, sobrenome, data de nascimento, sexo, número de registro, leito ou ambulatório e espe-

cialidade). Também deve estar identificado quem realizou a coleta. Atualmente, uma alternativa eficaz para o cadastramento de amostras é a utilização de etiquetas impressas com código de barras. Vale ressaltar, ainda, que é indispensável que a equipe laboratorial seja composta por pessoal devidamente instruído e treinado.

O cadastro do paciente no sistema do laboratório deve estar em cumprimento com a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC Anvisa), número 302, de 13 de abril de 2005, que inclui: número do prontuário e do registro de identificação do paciente gerado pelo laboratório, nome do paciente, idade, sexo, procedência, telefone ou endereço (quando aplicável), nome e contato do responsável pelo paciente (quando aplicável), nome e contato do solicitante do exame, data e hora de atendimento, horário da coleta, informações adicionais relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso e data prevista para entrega do laudo.

CRITÉRIOS DE ACEITABILIDADE DA AMOSTRA

O laboratório de microbiologia deve determinar critérios de avaliação e rejeição das amostras para assegurar melhor correlação clínico-laboratorial.

As amostras podem ser rejeitadas por identificação inadequada ou falta de identificação no frasco da amostra, pela realização de coleta em frasco inadequado ou danificado, por apresentar volume insuficiente, pela armazenagem e/ou transporte inadequado, pela coleta de amostra fora do horário especificado, por terem sido realizadas mais de três coletas em período de 24 horas, entre outros fatores. Em todos os casos citados, nova coleta deve ser realizada. Entretanto, quando houver exceção e for realizada hemocultura com volume de sangue menor do que o ideal, tal informação deve estar contida no resultado, a fim de elucidar a diminuição da sensibilidade do exame.

PROCESSAMENTO

Os frascos específicos para hemocultura contêm o anticoagulante polianetol-sulfonato sódico (SPS) em concentrações que variam de 0,025 a 0,05%, visto que o rendimento da hemocultura é reduzido se o sangue coagular, sendo recomendada sua transferência imediata para o frasco de hemocultura, garantindo o crescimento bacteriano imediato.

Na hemocultura, pode-se realizar pesquisa de micro-organismos aeróbicos, anaeróbicos, *Brucella* sp, micobactérias, *Listeria* sp, fungos e antibiograma.

Devem-se utilizar frascos apropriados e, em casos de requerimento de cultura para pesquisa de bactérias anaeróbicas, o sangue deve ser injetado em

frascos e meios de cultura especiais para esse tipo de procedimento. Contudo, a menor incidência de infecções de corrente sanguínea causada por bactérias anaeróbicas estritas indica que não há necessidade do uso de frascos de anaeróbicos em rotina. Em casos em que forem solicitadas hemoculturas para aeróbicos e anaeróbicos e em que o volume de sangue não seja satisfatório, ele deve ser primeiramente inoculado em frasco para pesquisa de micro-organismos aeróbicos, a fim de garantir uma proporção de volume de sangue ideal, e qualquer sangue remanescente deve ser inoculado para pesquisa de patógenos anaeróbicos.

Os frascos de hemocultura encaminhados ao laboratório devem ser incubados em estufa na temperatura de 35 a 37°C. Apesar de a maioria dos patógenos ser isolada em até 72 horas, recomenda-se período de incubação de 7 dias para metodologias manuais e de 5 dias para métodos automatizados. Em casos de métodos manuais, subcultivos devem ser realizados durante esse intervalo.

Exceto em casos de suspeita de infecção por micro-organismos que exigem hemocultura em frascos específicos, se a cultura for negativa dentro de 24 a 48 horas, devem ser coletadas mais duas ou três amostras e estas devem ser injetadas em frascos para crescimento de bactérias aeróbicas. Tal escolha se deve ao fato de frascos aeróbicos serem mais produtivos do que aqueles específicos para anaeróbicas, uma vez que os primeiros permitem crescimento de bactérias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e leveduras, além da baixa proporção de infecções de corrente sanguínea causadas por agentes anaeróbicos estritos, conforme já citado.

O Manual de Coleta de Amostras deve definir instruções específicas para o processamento, de acordo com o tipo de sistema utilizado, manual ou automatizado, sendo este último um sistema mecânico que realiza incubação, agitação e/ou monitoramento do crescimento microbiano nos frascos contendo o meio de cultura.

BIBLIOGRAFIA

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Módulo 3. Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Assunto+de+Interesse/Aulas+Cursos+Cartazes+Publicacoes+e+Seminarios>. Acessado em: 24 mar 2014.

2. Araujo MRE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control* 2012;1(1):8-19.
3. CLSI. Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
4. Correa JA. Garantia da Qualidade no Laboratório Clínico. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade – PNCQ – Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2008.
5. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbial Infect* 2013;(6):492-500.
6. Storer A. Clinical Practice Guideline: Prevention of Blood Culture Contamination. Des Plaines. Emergency Nurses Association (ENA); 2011.
7. Versalovic J. Manual of clinical microbiology. In: Petti CA, PW M, CC K. Systems for detection and identification of bacteria and yeasts. 11.ed. Washington: ASM Press, 2011. p.15-26.
8. Versalovic J. Manual of clinical microbiology. In: Baron EJ, BT Jr R. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. 11.ed. Washington: ASM Press, 2011. p.228-71.
9. Vieira KE, Shitara ES, Mendes ME, Sumita NM. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. *J Bras Patol Med Lab* 2011;47(3):201-10.

3.3. Cultura de líquidos cavitários

EXISTEM NO ORGANISMO humano vários líquidos em determinadas cavidades, que são normalmente estéreis, mas que podem ser invadidos e infectados por bactérias, fungos, vírus e parasitas. Por serem normalmente estéreis, o achado de qualquer quantidade de micro-organismos nesses líquidos é importante para configurar um processo infeccioso

Este capítulo apresentará o estudo microbiológico dos líquidos pleural, peritoneal, pericárdico e sinovial. Também serão referidas as características microbiológicas do líquido de diálise peritoneal.

LÍQUIDO PLEURAL

O líquido pleural está localizado entre a pleura parietal e visceral. Normalmente é transparente e contém poucas células e baixa quantidade de proteínas.

Quando esse conteúdo líquido aumenta sem que haja aumento das células e proteínas, forma o transudato, que não apresenta micro-organismos. Por outro lado, quando o conteúdo de leucócitos e proteínas aumenta, forma-se o que se chama de exsudato, que geralmente é provocado por uma infecção, embora tumores e respostas autoimunes também possam produzir processos inflamatórios da cavidade pleural. Quando o exsudato contém numerosos polimorfonucleares e tem aspecto purulento é chamado de empiema. Em geral, é secundário a pneumonias bacterianas.

Os agentes etiológicos mais frequentes das infecções da cavidade pleural são: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* e anaeróbios estritos.

Também podem ser isolados micobactérias, fungos e actinomicetos.

Coleta e transporte

O material para processamento laboratorial é colhido por aspiração com agulha e seringa estéreis do espaço pleural e colocado em um tubo estéril para pesquisa de anaeróbios facultativos, fungos e micobactérias. Não se recomenda o uso de tubos que contenham anticoagulante que não seja o polianetol sulfonato de sódio (SPS). Outros anticoagulantes, como o citrato de sódio ou o EDTA, podem diminuir a viabilidade de determinadas espécies microbianas.

Para a pesquisa de anaeróbios estritos, recomenda-se colocar uma alíquota em um tubo estéril contendo tioglicolato de sódio, que, por suas características redutoras, mantém a viabilidade dessas bactérias. Não é recomendado o envio do material com seringa e agulha para evitar os acidentes perfurocortantes.

Antes da punção, deve ser realizada cuidadosa antisepsia da parede torácica no local. Esse procedimento deve ser realizado com tintura de iodo 1% ou iodopovidona (PVPI) a 10%. É importante lembrar que, após a punção, a solução de iodo deve ser removida com álcool a 70% para evitar queimaduras ou reações alérgicas.

Quanto maior a quantidade de líquido enviada ao laboratório, maiores são as possibilidades de isolar o agente. Em geral, 1 a 5 mL são adequados. No caso de pesquisa de fungos ou micobactérias, recomenda-se um volume de pelo menos 5 mL.

O material deve ser enviado ao laboratório em temperatura ambiente (20 a 30°C) em período máximo de 2 horas. Alternativamente, uma alíquota do material (2 a 10 mL) pode ser inoculada em um frasco de hemocultura e enviada assim ao laboratório. Nesse caso, lembra-se que sempre deve ser enviada uma alíquota sem diluir em um tubo para realizar o exame microscópico direto ou por coloração. Uma vantagem em se utilizar frascos de hemocultura é que a composição dos meios contempla inibidores de antimicrobianos, que são especialmente úteis quando o paciente já está em tratamento antimicrobiano no momento da punção.

Na suspeita de infecção por micobactérias, recomenda-se semear também a amostra em frasco de hemocultura com meio específico para essas bactérias.

As amostras semeadas em frascos de hemocultura devem também ser mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao laboratório em até 12 horas após a semeadura do material.

LÍQUIDO PERITONEAL

O peritônio é uma membrana serosa com duas faces. Entre essas duas faces, existe uma cavidade chamada cavidade peritoneal, na qual estão localizados

fígado, estômago, pâncreas, baço, intestinos, bexiga, ovários e tubas uterinas. Os rins estão atrás dessa face e por isso são chamados órgãos retroperitoneais.

No ser humano normal existe nessa cavidade um pequena quantidade de líquido com pouca quantidade de células e proteínas. Diferentes processos, infecciosos ou não, podem fazer com que essa quantidade de líquido aumente, condição que é chamada de ascite e o líquido denomina-se líquido ascítico. Quando a etiologia da ascite é infecciosa, existe um aumento da quantidade de células e proteínas. Os agentes infecciosos podem entrar na cavidade peritoneal, provocando um processo inflamatório das membranas peritoneais – a peritonite.

De acordo com a forma como o agente chega à cavidade peritoneal, dividem-se as peritonites em primárias ou secundárias. Nas peritonites primárias, não existe um foco aparente de infecção e o agente chega por via hematogênica e linfática. Nesses casos, os agentes que podem ser isolados são *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus* spp, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Candida* spp.

A peritonite secundária aparece como consequência de penetração direta do agente na cavidade peritoneal a partir de algum órgão abdominal ou pélvico (ruptura traumática do intestino, apêndice perfurado, salpingite, etc.). Nesses casos, os agentes mais frequentes são *Enterobacteriaceae* e anaeróbios estritos.

Coleta e transporte

O material para processamento laboratorial é colhido por aspiração com agulha e seringa estéreis da cavidade peritoneal e colocado em um tubo estéril, para pesquisa de anaeróbios facultativos, fungos e micobactérias. Não é recomendado o uso de tubos que contenham anticoagulante que não seja o SPS. Outros anticoagulantes, como o citrato de sódio ou o EDTA, podem diminuir a viabilidade de determinadas espécies microbianas.

Para a pesquisa de anaeróbios estritos, recomendamos colocar uma alíquota em um tubo estéril contendo tioglicolato de sódio, que por suas características redutoras, mantém a viabilidade dessas bactérias. Não é recomendado o envio do material com seringa e agulha para evitar os acidentes perfurocortantes.

Antes da punção deve ser realizada cuidadosa antissepsia da parede abdominal no local. Este procedimento deve ser realizado com tintura de iodo 1% ou PVPI a 10%. Deve-se lembrar que, após a punção, a solução de iodo deve ser removida com álcool a 70% para evitar queimaduras ou reações alérgicas.

Quanto maior é a quantidade de líquido enviada ao laboratório, maiores são as possibilidades de isolar o agente. Em geral, de 1 a 5 mL são adequados. No

caso da pesquisa de fungos ou micobactérias, é recomendado um volume de pelo menos 5 mL.

O material deve ser enviado ao laboratório à temperatura ambiente (20 a 30°C), em um período máximo de 2 horas.

Alternativamente, uma alíquota do material (2 a 10 mL) pode ser inoculada em um frasco de hemocultura e enviada assim ao laboratório. Nesse caso, lembramos que sempre deve ser enviada uma alíquota sem diluir em um tubo para realizar o exame microscópico direto ou por coloração. Uma vantagem em se utilizar frascos de hemocultura é que a composição dos meios contempla inibidores de antimicrobianos, que são especialmente úteis quando o paciente já está em tratamento antimicrobiano no momento da punção.

Na suspeita de infecção por micobactérias, recomendamos semear também a amostra em um frasco de hemocultura com meio específico para estas bactérias. As amostras semeadas em frascos de hemocultura devem também ser mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao laboratório em até 12 horas após a semeadura do material.

LÍQUIDO PERICÁRDICO

O coração e os grandes vasos estão envolvidos por uma membrana chamada pericárdio, que deixa uma área virtual até o epicárdio, que envolve o coração. Nessa cavidade, existe uma pequena quantidade de líquido transparente (15 a 20 mL).

Na presença de agentes infecciosos, essa quantidade aumenta, assim como as proteínas e células inflamatórias. Esse processo inflamatório é chamado de pericardite.

As bactérias que mais frequentemente provocam esse quadro são: *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e *Mycobacterium tuberculosis*.

O quadro também pode ser produzido por vírus, fungos e parasitas. Muitas vezes, o quadro de pericardite está acompanhado de uma inflamação do músculo cardíaco chamada de miocardite.

Coleta e transporte

O material para processamento laboratorial é colhido por aspiração com agulha e seringa estéreis da cavidade pericárdica e colocado em um tubo estéril, para pesquisa de anaeróbios facultativos, fungos e micobactérias. Não se recomenda o uso de tubos que contenham anticoagulante que não seja o SPS. Outros anti-

coagulantes, como o citrato de sódio ou o EDTA, podem diminuir a viabilidade de determinadas espécies microbianas.

Antes da punção, deve ser realizada cuidadosa antisepsia da parede torácica no local. Esse procedimento deve ser realizado com tintura de iodo 1% ou PVPI a 10%. Deve-se lembrar que, após a punção, a solução de iodo deve ser removida com álcool a 70% para evitar queimaduras ou reações alérgicas.

Quanto maior a quantidade de líquido enviada ao laboratório, maiores são as possibilidades de isolar o agente. Em geral, de 1 a 5 mL são adequados. No caso da pesquisa de fungos ou micobactérias, é recomendado um volume de pelo menos 5 mL.

O material deve ser enviado ao laboratório em temperatura ambiente (20 a 30°C) em um período máximo de 2 horas. Alternativamente, uma alíquota do material (2 a 10 mL) pode ser inoculada em um frasco de hemocultura e enviada assim ao laboratório. Nesse caso, lembra-se que sempre deve se enviar uma alíquota sem diluir em um tubo para realizar o exame microscópico direto ou por coloração. Uma vantagem em se utilizar frascos de hemocultura é que a composição dos meios contempla inibidores de antimicrobianos, que são especialmente úteis quando o paciente já está em tratamento antimicrobiano no momento da punção.

Na suspeita de infecção por micobactérias, recomenda-se semear também a amostra em um frasco de hemocultura com meio específico para essas bactérias. As amostras semeadas em frascos de hemocultura devem também ser mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao laboratório em até 12 horas após a semeadura do material.

LÍQUIDO SINOVIAL

A inflamação das articulações é chamada de artrite e pode ser produzida por multiplicação direta do agente na articulação ou por reações antígeno-anticorpo nas doenças autoimunes. No caso das infecções bacterianas, os agentes podem infectar por via hematogênica ou por extensão direta de uma infecção do osso contíguo. Os processos podem ser mono ou poliarticulares.

A inflamação provoca aumento da quantidade de líquido sinovial e aumento das proteínas e células. O agente mais frequente é o *Staphylococcus aureus*. Outras bactérias que provocam o quadro são: *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*.

No caso de infecção de próteses articulares, a contaminação pode ocorrer durante a cirurgia e pode se manifestar clinicamente até 1 ano após o procedi-

mento. Nesses casos, os agentes mais frequentes são *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp e *Propionibacterium* spp.

Coleta e transporte

O material para processamento laboratorial é colhido por aspiração com agulha e seringa estéreis do espaço sinovial e colocado em um tubo estéril, para pesquisa de anaeróbios facultativos, fungos e micobactérias. Não se recomenda o uso de tubos que contenham anticoagulante que não seja o SPS. Outros anticoagulantes, como o citrato de sódio ou o EDTA podem diminuir a viabilidade de determinadas espécies microbianas.

Antes da punção deve ser realizada cuidadosa antissepsia da pele no local. Esse procedimento deve ser realizado com tintura de iodo 1% ou PVPI a 10%. Deve-se lembrar que após a punção a solução de iodo deve ser removida com álcool a 70% para evitar queimaduras ou reações alérgicas.

Quanto maior a quantidade de líquido enviada ao laboratório, maiores são as possibilidades de isolar o agente. Em geral, 1 a 5 mL são adequados. O material deve ser enviado ao laboratório em temperatura ambiente (20 a 30°C) em período máximo de 2 horas.

Alternativamente, uma alíquota do material (2 a 10 mL) pode ser inoculada em um frasco de hemocultura e enviada assim ao laboratório. Nesse caso, lembra-se que sempre deve ser enviada uma alíquota sem diluir em um tubo para realizar o exame microscópico direto ou por coloração. Uma vantagem em se utilizar frascos de hemocultura é que a composição dos meios contempla inibidores de antimicrobianos, que são especialmente úteis quando o paciente já está em tratamento antimicrobiano no momento da punção.

As amostras semeadas em frascos de hemocultura devem também ser mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao laboratório em até 12 horas após a semeadura do material

LÍQUIDO DE DIÁLISE PERITONEAL

Pacientes com insuficiência renal são tratados com diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Nesse tratamento, líquidos com eletrólitos são injetados na cavidade peritoneal e depois removidos, o que permite uma troca de eletrólitos e a remoção de substâncias tóxicas.

Como a solução é injetada por meio de um cateter, existe perda da barreira mecânica da pele, o que aumenta o risco de infecção. Em média, um paciente corre o risco de ter duas infecções por ano.

O diagnóstico de peritonite é feito quando o líquido de diálise aparece turvo, ou o paciente apresenta dor abdominal e a cultura do dialisado é positiva.

Os agentes mais frequentes são *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus*, bacilos Gram-negativos, *Enterococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

Coleta e transporte

O material para processamento laboratorial é colhido por aspiração com seringa estéril do cateter utilizado para a diálise e colocado em um tubo estéril, para pesquisa de anaeróbios facultativos e fungos. Não se recomenda o uso de tubos que contenham anticoagulante que não seja o SPS. Outros anticoagulantes, como o citrato de sódio ou o EDTA, podem diminuir a viabilidade de determinadas espécies microbianas.

Quanto maior a quantidade de líquido enviada ao laboratório, maiores são as possibilidades de isolar o agente, já que o número de bactérias infectantes habitualmente é muito baixo. Em geral, 5 a 10 mL são adequados.

O material deve ser enviado ao laboratório à temperatura ambiente (20 a 30°C), em um período máximo de 2 horas. Alternativamente, uma alíquota do material (5 a 10 mL) pode ser inoculada em um frasco de hemocultura e enviada assim ao laboratório. Nesse caso, lembra-se que sempre deve ser enviada uma alíquota sem diluir em um tubo para realizar o exame microscópico direto ou por coloração. Uma vantagem em se utilizar frascos de hemocultura é que a composição dos meios contempla inibidores de antimicrobianos, que são especialmente úteis quando o paciente já está em tratamento antimicrobiano no momento da coleta.

As amostras semeadas em frascos de hemocultura devem também ser mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao laboratório em até 12 horas após a semeadura do material.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras devem estar identificadas com os seguintes pontos importantes: nome e registro do paciente, leito e especialidade, material colhido, data e hora da coleta e nome do médico que realizou a punção.

Amostras que não cumpram os requisitos descritos de identificação, coleta em tubo não estéril ou maior tempo de transporte devem ser recebidas pelo laboratório, já que é muito difícil a realização de nova punção. Recomenda-se, nesse caso, contatar o médico requisitante, explicando as falhas encontradas e as possíveis consequências no resultado do exame. O laudo também deve ter nota explicando as características não conformes da amostra.

PROCESSAMENTO LABORATORIAL DOS LÍQUIDOS CAVITÁRIOS

Para o processamento laboratorial, recomendam-se as seguintes técnicas.

Amostras líquidas recebidas em recipiente estéril

Centrifugar uma alíquota do material a 3.000 rpm durante 15 minutos. Separar o sobrenadante e utilizar o sedimento para o processamento microbiológico. Realizar o exame microscópico direto ou por coloração, dependendo da suspeita clínica. Reportar de imediato o resultado do exame microscópico, porque este pode ser de enorme valia para a orientação terapêutica precoce.

A semeadura para bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas deve ser feita em ágar sangue, ágar chocolate e ágar MAC. Para bactérias anaeróbias estritas, semear em ágar *Brucella* enriquecido com sangue, hemina e menadiona. Esse meio deve ser incubado em jarra de anaerobiose durante 48 horas a 35°C.

O ágar chocolate deve ser incubado em estufa de CO₂ ou em jarra com um gerador de CO₂ que produza uma atmosfera de 5 a 10% desse gás, a 35°C, por 24 horas. Ágar sangue e ágar MAC devem ser incubados em estufa com atmosfera normal a 35°C por 24 horas.

Se as culturas forem negativas em 24 horas, incubar por mais 24 horas. No caso dos anaeróbios estritos, incubar por mais 48 horas se a primeira observação de 48 horas não acusar crescimento bacteriano.

Na suspeita de infecção por micobactérias, semear em meios específicos como o Lowenstein Jensen, incubando os meios por 4 a 6 semanas. Na suspeita de fungos, semear em meios específicos nas temperaturas recomendadas, de acordo com a suspeita do agente etiológico.

Se com 24 horas ou 48 horas as placas mostrarem crescimento microbiano, deve-se proceder à identificação do agente e aos estudos de suscetibilidade aos antimicrobianos. Se, após esses passos, as culturas continuarem negativas, o resultado deve ser reportado como negativo.

Amostra enviada em frasco de hemocultura

O frasco deve ser colocado em estufa própria com agitação, o que favorece o crescimento bacteriano. Os frascos positivos devem ser processados de acordo com o recomendado nas hemoculturas, realizando a identificação do agente e o estudo da sua suscetibilidade. Se o frasco não apresentar positividade após um período de incubação adequado para o agente suspeito de causar a infecção, o resultado deve ser reportado como negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Baron EJ, Sharp SE. Clarification on specimen collection and transportation for intra-abdominal infections. *Clin Infect Dis* 2010;51:759.
2. Jousimies-Sommer H et al. *Walsworth KTL Anaerobic bacteriology manual*. Belmont: Star Publishing, 2002.
3. Miller JM. *A Guide to specimen management in clinical microbiology*. 2.ed. Washington: ASM Press, 1998.
4. Oplustil CP et al. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
5. Oplustil CP et al. *Microbiologia clínica. Coleção 156 perguntas e respostas*. v.2. São Paulo: Sarvier, 2012.
6. Runyon BA et al. Bedside inoculation of blood culture bottles with ascitic fluid is superior to delayed inoculation in the detection of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2811-2.
7. Solomkin JS et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infections in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infection Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50:133-64.
8. Versalovic J et al. *Manual of clinical microbiology*. 10.ed. Washington: ASM Press, 2011.
9. Zappe B et al. *Propionibacterium spp* in prosthetic joint infections: a diagnostic challenge. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008;128:1039-46.

3.4. Cultura de secreções e cateter

OS MICRO-ORGANISMOS SÃO encontrados em todos os ambientes inanimados e em associação com outros organismos vivos, incluindo as plantas, os animais e o homem. No entanto, apesar da distribuição universal, as bactérias são responsáveis pela maioria das doenças infecciosas, seguidas pelos vírus. A relação entre as bactérias e o homem tem características que devem ser conhecidas tanto pelo microbiologista como pelos profissionais de saúde que atendem o paciente, principalmente o médico. A pele e as mucosas do organismo humano apresentam microbiota que pode ser permanente ou transitória e que sofre influências do sítio anatômico, da fisiologia desse sítio, da suscetibilidade aos patógenos e da morbidade do hospedeiro.

Sabe-se que muitos fungos e bactérias que compõem o meio ambiente ou a microbiota normal podem causar doenças em indivíduos severamente comprometidos, especialmente quando há imunossupressão, como ocorre nos pacientes transplantados, casos em que acontecem mudanças dramáticas no potencial do hospedeiro de tornar-se suscetível a esses micro-organismos. A utilização de cateter venoso central é um fator de risco importante para infecções da corrente sanguínea, cujos agentes mais prevalentes são os que compõem a microbiota da pele, o que torna essencial a adequação da fase pré-analítica do exame microbiológico para que o médico-assistente e o laboratório de microbiologia considerem assertivamente o micro-organismo isolado como o agente responsável ou não pelo processo infeccioso.

O conhecimento e a integração dos vários profissionais da equipe que presta assistência ao paciente, como médicos, enfermeiros, coletores e outros envolvidos no cuidado ao paciente, são muito importantes para que a tarefa do laboratório

de microbiologia seja adequadamente cumprida. Por isso, é fundamental a comunicação constante entre o microbiologista e os outros profissionais, pois a ausência dessa integração ou a não compreensão das informações de relevância clínica contidas no pedido ou no laudo do exame leva os laboratórios de microbiologia a enfrentarem críticas ou até a serem questionados quanto aos seus resultados.

A eficiência do laboratório de microbiologia em reportar resultados corretos depende da seleção do sítio para a coleta, do procedimento e do transporte adequado da amostra biológica. Coleta e transporte inadequados são fatores que interferem no isolamento do agente responsável pelo processo infeccioso, podendo acarretar maior recuperação de contaminantes e, conseqüentemente, induzir ao tratamento inapropriado do paciente.

É importante salientar que toda informação diagnóstica do laboratório de microbiologia clínica é influenciada pela qualidade da amostra biológica recebida e que a acurácia do exame microbiológico depende de vários fatores envolvidos nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Os principais fatores que influenciam a qualidade das fases do exame microbiológico são:

1. Pré-analítica: hipótese diagnóstica, escolha do local para coleta, coleta, transporte da amostra clínica, cadastro do exame e triagem da amostra clínica.
2. Analítica: escolha adequada do método de coloração, dos meios de cultura e incubação para o processamento da amostra clínica.
3. Pós-analítica: interpretação do resultado, liberação do laudo corretamente no menor tempo possível.

PEDIDO MÉDICO

O pedido médico deve conter o máximo de informações que orientem o laboratório de microbiologia na busca do resultado mais adequado para o exame, portanto deve apresentar os itens a seguir.

- Identificação clara do paciente. Nome completo, número de um registro pessoal ou institucional e data de nascimento, para evitar problemas com homônimos e com a faixa etária.
- Informações sobre o paciente relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso (Tabela 1).

Tabela 1 Informações sobre o paciente relevantes para o diagnóstico do processo infeccioso

| Dados relevantes | Exemplos |
|---|--|
| Hipótese diagnóstica | Tuberculose, micose profunda, etc. |
| Achados clínicos mais significativos | Lesões cutâneas ou de mucosas, local e características do sítio de infecção, etc. |
| Dados epidemiológicos relevantes | Doença ocupacional (p.ex., brucelose) Viagem ou excursão, se vive em área endêmica de alguma doença infecciosa (p.ex., malária, riquetsioses, cólera), se mantém contato com animais, acidentes (p.ex., mordida, trauma, picada de carrapato, enchentes), envolvimento em surto de infecção relacionada à assistência à saúde, etc. |
| Provável origem do processo infeccioso | Adquirida na comunidade Adquirida em assistência à saúde (hospitalar): relacionado a procedimento invasivo? Qual? (cirurgia, cateter de curta ou longa duração, sonda vesical, traqueostomia, diálise, alimentação parenteral, etc.) |
| Fez uso nos últimos 10 dias de antimicrobianos? | Qual ou quais? |
| Doença de base ou comorbidades | Existe comprometimento imunológico? Qual? |

Obs.: verificar se o paciente foi transferido ou se teve alta de outro hospital nos últimos 30 dias.
Conferir também se é portador, colonizado ou infectado por bactérias multirresistentes.

- Descrição da amostra clínica e seu sítio de coleta.
- Campo para identificação do exame no laboratório (número da análise microbiológica e seção do laboratório).
- Natureza do teste solicitado.
- Testes de sensibilidade aos antimicrobianos ou fungos.

COLETA E TRANSPORTE DA AMOSTRA CLÍNICA

O diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas começa com a indicação clínica adequada do exame microbiológico, portanto, o conhecimento da epidemiologia e fisiopatologia do processo infeccioso tem fundamental impor-

tância para que a indicação seja bem feita. Contudo, a coleta e o transporte da amostra são etapas críticas na execução do exame microbiológico. O sítio de infecção deve ser cuidadosamente selecionado e, para que a amostra seja adequada, devem ser considerados alguns conceitos básicos gerais:

- O conhecimento da história natural e da fisiopatologia dos processos infecciosos é fundamental na determinação do período ótimo para a coleta da amostra clínica para o exame microbiológico. Esse momento, além de ser determinado pelo tipo de doença infecciosa, depende também da habilidade do laboratório em executar esse exame.
- Sendo os antibióticos agentes bactericidas ou bacteriostáticos, podem dificultar o crescimento bacteriano, por isso, sempre que possível, deve-se coletar a amostra antes da administração da terapêutica antimicrobiana, sempre tendo a informação de qual antimicrobiano o paciente está utilizando.
- A amostra clínica deve representar o material do verdadeiro local da infecção. Portanto, deve ser evitada a sua contaminação a partir de tecidos adjacentes.
- Deve ser obtida quantidade de material suficiente para serem executadas as técnicas de cultivo solicitadas, evitando assim resultado falso-negativo.
- A suspeita de potencial agente etiológico define o método de coleta adequado e o sistema de transporte que suporte a viabilidade do micro-organismo responsável pela infecção. Por isso, deve-se sempre utilizar materiais e métodos adequados para a execução desses procedimentos, o que implica a utilização de frascos estéreis, com ou sem meio de transporte, ou com solução salina 0,89%, e que devem ser tampados de modo a evitar vazamentos ou contaminações durante o transporte.
- Apesar da ampla utilização do *swab* na coleta de amostra, principalmente de secreções, ele deve ser evitado. Caso seja inevitável a sua utilização, devem ser confeccionados com algodão alginatado e encaminhados ao laboratório em meio de transporte ou em solução salina 0,89%, nunca secos, o mais rápido possível.
- Existem micro-organismos que exigem cultivos especiais, por isto é de fundamental importância informar sempre ao laboratório a suspeita de um agente infeccioso específico. Por exemplo: micobactérias, *Campylobacter* spp, *Legionella* spp, etc.
- Deve-se ter sempre o conhecimento da origem da amostra e/ou sítio de coleta para que os meios de cultura sejam corretamente selecionados.

- Sempre identificar adequadamente o frasco encaminhado para o laboratório, facilitando o retorno do resultado para o paciente.
- Os membros da equipe envolvida com coleta de amostras biológicas devem ter em mente que os micro-organismos são seres vivos, que se multiplicam e morrem rapidamente. Se isto ocorrer durante a coleta, o transporte ou a estocagem, a amostra clínica enviada não será representativa do processo infeccioso. Portanto, deve-se encaminhar a amostra biológica ao laboratório imediatamente após a coleta com a finalidade de assegurar o isolamento, principalmente dos micro-organismos mais sensíveis e exigentes, além de evitar o isolamento de bactérias da microbiota normal, que geralmente são mais resistentes e menos exigentes. Independentemente do sistema de transporte usado, o objetivo principal é reduzir ao mínimo o período que decorre entre a coleta e o processamento da amostra.
- Toda amostra clínica deve ser considerada potencialmente infectante, por isso, deve ser manuseada com muito cuidado.

A suspeita clínica do processo infeccioso determina o tipo de amostra que deve ser coletada para confirmar, estabelecer ou complementar o diagnóstico clínico. Dependendo da amostra a ser colhida, serão necessários alguns cuidados específicos.

TRATO RESPIRATÓRIO

Secreção de orofaringe

A amostra clínica é coletada da orofaringe ou tonsilas utilizando-se uma zaragatoa (*swab*) de algodão alginatado, evitando-se a contaminação com secreção da mucosa oral e/ou da língua, o que é facilitado com um abaixador de língua. A amostra deve ser colocada em meio de transporte, sendo o ágar Stuart o mais utilizado. Há recomendações para que, se possível, a inoculação em ágar sangue de carneiro a 5% seja feita imediatamente após a coleta, sem a utilização do meio de transporte, portanto, à beira do leito.

Não deve ser utilizado medicamento tópico nas últimas 6 horas. O jejum não interfere no exame propriamente dito, mas recomenda-se que a coleta da amostra seja feita no mínimo 2 horas após a refeição.

Secreção de nasofaringe

A secreção de nasofaringe é coletada utilizando-se um *swab* de algodão alginatado especial, com alça fina e flexível, ou aspirada com um cateter nasofaríngeo. Este

deve ser introduzido cuidadosamente na narina do paciente e delicadamente levado até a nasofaringe, onde será coletada a amostra. O *swab* é colocado em meio de transporte, o ágar Stuart, e se a amostra for coletada por meio de cateter, deve ser encaminhada no recipiente de coleta.

Secreção nasal

A secreção nasal é utilizada principalmente para pesquisa de indivíduos portadores de *S. aureus* e é coletada com um *swab* de algodão alginatado, que deve ser introduzido cuidadosamente na narina do paciente e rolado contra a mucosa interna.

A amostra deve ser encaminhada ao laboratório em meio de transporte ágar Stuart.

Secreção de seios nasais

A amostra de escolha para o diagnóstico de sinusite é obtida por meio de aspirado de seios nasais, após descontaminação do local da punção com antissepsia rigorosa. A amostra deve ser transportada em frasco para anaeróbio ou na própria seringa utilizada na coleta, mas não deve ser refrigerada.

Escarro

O exame microbiológico do escarro tem grande valor diagnóstico, principalmente de micobacterioses, fungos patogênicos e *Legionella* spp, mas é inadequada para a cultura de anaeróbio. A coleta deve ser muito cuidadosa e a interpretação do resultando também, pois o trato respiratório superior pode ser colonizado por prováveis patógenos respiratórios.

O ideal é que a coleta seja feita pela manhã e supervisionada por um profissional de saúde. O paciente deve ser orientado a enxaguar a boca e fazer gargarjo com água antes da coleta, e não coletar saliva ou secreção nasal posterior. Ele deve tossir algumas vezes para desprender a secreção pulmonar. A amostra deve ser coletada e transportada em frasco estéril, que deve estar adequadamente identificado com os dados do paciente, data e hora de coleta, e encaminhada rapidamente ao laboratório.

Devem ser enviados ao laboratório no mínimo 2 mL de amostra, adequadamente coletada e transportada. Apenas uma amostra em 24 horas é suficiente para o diagnóstico de doenças causadas pelos patógenos mais prevalentes, mas para a detecção por fungos ou micobactérias, devem-se coletar 2 a 3 amostras em dias consecutivos. Segundo o Consenso de Tuberculose de 1997, para o

diagnóstico, a primeira amostra deve ser coletada no momento da consulta, a segunda pela manhã do dia consecutivo e a terceira deve ser solicitada se a hipótese for forte e os dois resultados anteriores forem negativos.

A amostra clínica deve ser processada em menos de 2 horas, evitando o supercrescimento da flora contaminante, o que dificultaria o isolamento do verdadeiro agente infeccioso, por isso, se a amostra não for processada dentro desse período, deve ser mantida a 4°C no máximo por 24 horas.

Escarro induzido

Alguns pacientes com processo infeccioso pulmonar apresentam pouca quantidade ou dificuldade na eliminação do escarro, sendo, nesses casos, indicada a coleta do escarro induzido, que deve ser feita após a inalação com solução salina hipertônica, composta de 20 a 30 mL de solução de NaCl de 0,85 a 10%. Os cuidados durante a coleta e o transporte são os mesmos descritos para o escarro. Deve-se lembrar que o *Histoplasma capsulatum* e o *Blastomyces dermatidis* sobrevivem pouco tempo nesse tipo de espécime clínico. O escarro pode não ser a amostra de escolha para determinar o agente etiológico de algumas pneumonias bacterianas, sendo sangue, lavado broncoalveolar ou aspirado transtraqueal os mais indicados.

Aspirado traqueal

A coleta da amostra do aspirado endotraqueal tem fácil execução e não é muito invasiva, mas pode apresentar alguns problemas, como coleta de amostra de secreção de nasofaringe no lugar de secreção endotraqueal e, principalmente, contaminação da amostra com a microbiota do trato respiratório superior.

A cânula de traqueostomia e dos respiradores torna-se rapidamente colonizada por bactérias Gram-negativas, portanto o isolamento desse agente pela cultura pode não indicar o agente infeccioso pulmonar, dificultando a interpretação do resultado, que deve ser muito bem correlacionado com os dados clínicos. Caso seja inevitável, essa coleta deve ser feita por aspiração transtraqueal ou por meio de cateter protegido. Está indicada quando o resultado tiver influência terapêutica e se os resultados da avaliação de amostras obtidas por procedimentos menos invasivos não foram esclarecedores.

Amostras broncoalveolares

As amostras broncoalveolares são coletadas com os recursos da broncoscopia, que foi desenvolvida em 1930, e tem sido usada primariamente para a investi-

gação de doenças pulmonares não infecciosas e, nos últimos 20 anos, tem sido muito utilizada para detecção de agentes infecciosos não usuais, em pacientes em uso de ventilação mecânica e principalmente em pacientes imunocomprometidos. Essas amostras incluem lavado broncoalveolar, escovado protegido e escovado não protegido, sendo que apenas o escovado protegido pode ser utilizado para o isolamento de bactérias anaeróbias, desde que o transporte seja feito em anaerobiose.

O lavado ou escovado broncoalveolar deve ser encaminhado imediatamente ao laboratório em frasco estéril e processado dentro de 1 hora, pois a recuperação de micro-organismos é feita por meio de cultura quantitativa, e qualquer demora no seu processamento pode alterar a contagem de colônias ou permitir a recuperação maior de contaminantes.

Para o diagnóstico de pneumonia por fungos, micobactérias e *Legionella* spp, apenas a cultura qualitativa é suficiente.

FERIDAS E ABSCESSOS

Pela presença da flora normal da pele, deve-se tomar cuidado para coletar amostra representativa do processo infeccioso. Esta deve ser coletada da borda interna da lesão, e não da secreção purulenta ou exsudato espontaneamente eliminados. Assim, a melhor amostra é a coletada por meio de biópsia.

Lesão aberta

Fazer debridamento da lesão e depois limpar com solução fisiológica. A amostra deve ser coletada da borda interna da lesão. Se usar *swab*, colocá-lo em meio de transporte ou solução salina 0,89% e encaminhar imediatamente ao laboratório.

Abscessos

A secreção de abscesso deve ser coleta por meio de punção. Portanto, para evitar contaminação por agentes da microbiota da pele, deve ser feita antisepsia no local da punção e coletar a amostra com seringa e agulha, colocando-a em frasco estéril. Se houver suspeita de micro-organismo anaeróbio, colocar a amostra em meio de transporte para anaeróbio e informar ao laboratório o sítio da infecção e a suspeita clínica.

A secreção de abscessos cavitários e a biópsia cerebral são amostras adquiridas por meio de processo cirúrgico. Sempre que possível, a secreção deve ser obtida por aspiração. Essas amostras clínicas devem ser encaminhadas rapida-

mente ao laboratório em condições de anaerobiose, isto é, na seringa ou em meio de transporte para anaeróbio.

TRATO GENITAL

As amostras do trato genital são submetidas ao exame microbiológico principalmente para detecção de patógenos sexualmente transmissíveis. O diagnóstico dessas infecções genitais depende fundamentalmente da amostra coletada, e a determinação da amostra apropriada depende do sítio da infecção e do micro-organismo suspeito, portanto, a integração entre o médico e o laboratório é essencial.

Trompa de Falópio ou anexos

O material é coletado por aspiração durante o procedimento cirúrgico; envia-se rapidamente ao laboratório 1 a 2 mL do material em meio de transporte para anaeróbio.

Glândula de Bartolin

Fazer a assepsia da pele e da mucosa com solução de iodopovidine a 10%; deixar secar, aspirar o material do ducto glandular e enviar rapidamente ao laboratório o material em meio de transporte para anaeróbio ou seringa vedada.

Cérvice uterino

A avaliação microbiológica da secreção do cérvix uterino é utilizada para o diagnóstico de infecções específicas pela *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, herpes-vírus *simplex*, *Actinomyces israelii* e papilomavírus humano. É a amostra de escolha para a detecção de *N. gonorrhoeae* em mulheres.

Ao coletar a amostra, umedecer o espéculo com solução fisiológica estéril; não deve ser utilizado lubrificante, pois este pode inibir crescimento bacteriano. Retirar o excesso de secreção que se apresenta no orifício externo do colo com *swab* ou gaze estéril e introduzir um *swab* estéril delicadamente no colo uterino e deixá-lo durante 15 ou 20 segundos, rotacionando-o para obter material das glândulas endocervicais. Encaminhar o *swab* em meio de transporte:

- *N. gonorrhoeae*: Stuart modificado ou Amies com carvão.
- *C. trachomatis*: fosfato de sucrose.
- Herpes-vírus *simplex*: Stuart modificado ou caldo de infusão de carne com antibiótico.
- *Actinomyces israelii*: transporte para anaeróbio.

Secreção vaginal

O exame microbiológico de secreção vaginal é utilizado para o diagnóstico de infecções por *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e para a detecção de vaginose.

A paciente deve ser orientada a não fazer uso de creme e/ou óvulos vaginais, nem de ducha com lavagem vaginal interna nas 48 horas que antecedem a coleta da amostra. A higiene íntima deve ser a habitual, com água e sabonete, somente externamente. Se for solicitado exame microbiológico de secreção uretral, deve estar pelo menos há 2 a 3 horas sem urinar. Ao coletar a amostra, umedecer o espéculo com solução fisiológica estéril; não deve ser utilizado lubrificante, pois este pode inibir o crescimento bacteriano. Se possível, a coleta deve ser feita pela manhã, seguindo as normas anteriores.

Coletar secreção da mucosa alta do canal vaginal com dois *swabs* estéreis. Encaminhar um *swab* em meio de transporte e outro em NaCl 0,89%, pois será necessário para preparar o esfregaço para o exame microscópico.

Secreção uretral

A avaliação microbiológica da secreção uretral é útil no diagnóstico das uretrites. No exame microscópico, é pesquisada a presença de *Trichomonas* spp e a bacterioscopia do esfregaço corado pelo Gram. Faz parte da cultura de rotina a pesquisa de diversos agentes, como a *N. gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Candida* spp. Para a detecção de outros agentes, como *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Chlamydia trachomatis*, são necessários métodos especiais.

O material deve ser colhido 2 a 3 horas após micção. Deve-se estimular a eliminação da secreção:

- **Na mulher:** massageando delicadamente a uretra contra a superfície púbica através da vagina; coletar a secreção com zaragatoa e colocar em meio de transporte, sendo o meio de Amies com carvão o mais recomendado, ou o meio de Stuart modificado.
- **No homem:** varia de acordo com a situação:
 - Secreção abundante:
 - Fazer assepsia da glândula com gazes embebidas em solução salina, iniciando pelo meato e a partir daí abrangendo toda a glândula e, em seguida, enxugar com gaze seca.
 - Solicitar ao paciente que faça a expressão do pênis, para que a secreção se exteriorize, coletar a amostra com *swab* alginatado e colocar em meio de transporte.

- *N. gonorrhoeae*: Stuart modificado ou Amies com carvão.
- *C. trachomatis*: fosfato de sucrose.
- Preparar o esfregaço em duas lâminas delimitadas de 1 × 2 cm, rolando-o de uma extremidade à outra da área, ou enviar o *swab* em salina 0,85%.
- Secreção escassa:
 - Após assepsia da glândula, introduzir um *swab* alginatado 2 a 3 cm no canal uretral, deixar durante 15 segundos, fazendo uma raspagem das paredes da uretra.
 - Preparar o esfregaço em duas lâminas com área padronizada de 1 × 2 cm, rolando o *swab* de uma extremidade da área a outra lentamente de uma única vez, para se obter um esfregaço o mais uniforme possível.
 - Coletar material com *swab* alginatado e colocá-lo em meio de transporte.
- Ausência de secreção:
 - Fazer assepsia da glândula com a orientação acima.
 - Coletar a urina de 1º jato, solicitando ao paciente para urinar apenas 5 mL; encaminhar para o laboratório em frasco estéril.

Cultura de secreção prostática, urina pós-massagem prostática e esperma

Estes são os materiais clínicos processados no diagnóstico laboratorial de prostatites e orquiepididimite. Historicamente, é definido como o melhor exame para diagnóstico de prostatites o método dos quatro frascos de Meares e Stamey, de 1968 (referência Meares), que avalia comparativamente urina e secreção prostática, obtidas sequencialmente, conforme segue: no frasco 1, colhe-se a urina de primeiro jato; frasco 2, urina jato médio pré-massagem prostática; frasco 3, líquido prostático pós-massagem; e frasco 4, o terceiro jato pós-massagem. O critério diagnóstico para prostatite bacteriana crônica consiste no resultado da cultura do líquido prostático (frasco 3) e/ou urina após massagem (frasco 4) com contagem superior a 5.000 UFC/mL. A contagem bacteriana do líquido prostático (frasco 3) e do primeiro jato pós-massagem (frasco 4) deve ser pelo menos 10 vezes maior que a do primeiro e segundo jatos pré-massagem (frascos 1 e 2). Quando as culturas dos frascos 1 e 2 forem negativas, qualquer contagem de culturas positivas nos frascos 3 e 4 precisam ser avaliadas com atenção. Devem ser utilizados ágar sangue e ágar Thayer Martin com incubação em microaerofilia. Para orquiepididimite, sugere-se coleta prévia de urocultura com jato médio seguida pela coleta do esperma. Considerar resultados da cultura de esperma com contagens maiores ou iguais a 5.103 UFC/mL para uropatógenos conven-

cionais e qualquer contagem para *N. gonorrhoeae*. Avaliar os resultados para descartar infecção do trato urinário primária ou concorrente a orquiepididimite.

Lesão genital

O uso prévio de medicamento tópico interfere no exame microbiológico, portanto deve ser suspenso durante 3 dias antes da coleta.

Limpar a superfície da lesão com NaCl 0,85%; se houver crosta, deve ser removida antes da coleta da amostra. Pressionar a base da lesão até a saída de fluido límpido; coletar o material com *swab* estéril. Para a bacterioscopia, coletar esse fluido colocando uma lâmina sobre a lesão ou com *swab* estéril em solução salina 0,85%.

Colocar em meio de transporte específico e encaminhar imediatamente ao laboratório.

INFECÇÃO RELACIONADA AO CATETER

Existem vários tipos de cateteres intravasculares: de curta permanência, de longa permanência, sistemas abertos e sistemas fechados.

Na implantação do cateter há o rompimento da barreira do tecido cutâneo, colocando o paciente em risco de desenvolver infecções relacionadas a esse tecido. O local da inserção do cateter torna-se colonizado com bactérias da pele do paciente, principalmente estafilococos, ou com as carreadas pelos profissionais de saúde. Esses agentes podem ser responsáveis por infecções locais, com a possibilidade de infecção primária da corrente sanguínea adquirida por meio da inserção, ou do lúmen, cuja fonte é a colonização do *hub* ou a infusão de fluidos contaminados.

A infecção relacionada ao cateter venoso central pode se manifestar como infecção do sítio de inserção, como celulite dos tecidos moles adjacentes ao túnel de inserção do cateter, e pelo fato de o cateter estar diretamente com espaço intravascular estéril, é grande o risco de resultar em bacteremia.

A coleta e o transporte são etapas críticas para a execução adequada do exame.

- **Infecção do sítio de inserção do cateter:** a coleta de secreção do sítio de inserção do cateter deve ser feita após a limpeza do local com solução fisiológica estéril e coletada com zaragatoa alginatada, colocada em meio de Stuart e encaminhada o mais rápido possível ao laboratório.
- **Infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter – bacteremia:** confirmação da infecção relacionada ao cateter venoso central requer a recupe-

ração do mesmo agente isolado na hemocultura. A cultura pode ser feita de três formas:

- **Amostra de sangue pareado:** esta opção de coleta é a de escolha, pois não há necessidade da remoção do cateter. Deve ser coletada uma amostra de sangue periférico e uma obtida pelo cateter no mesmo momento, contendo o mesmo volume de sangue. Se não houver possibilidade da coleta do sangue periférico, é recomendada a coleta de ≥ 2 amostras de sangue obtidas de diferentes lumens do cateter. As amostras de sangue são imediatamente inseridas nos frascos de hemoculturas, que são rapidamente enviados ao laboratório. A interpretação do resultados é feita dependendo do método de cultura utilizado.
- **Cultura da ponta do cateter:** a mais frequentemente utilizada quando o cateter é de curta duração ou intravascular, mas só é feita após a indicação clínica e retirada do cateter. Deve ser evitada a contaminação do cateter durante sua retirada, sendo necessário que esse procedimento seja realizado em condições totalmente assépticas. Após sua retirada, cortar 5 cm do segmento distal do cateter e colocá-lo em tubo cônico estéril. Encaminhá-lo rapidamente ao laboratório, pois seu processamento deve ser realizado dentro de 2 horas. A demora na inoculação nos meios adequados resulta em ressecamento da amostra e, conseqüentemente, em erro na interpretação do resultado da cultura. Se houver secreção no local da inserção do cateter, esta também deve ser enviada ao laboratório para o exame microbiológico. A cultura da ponta de cateter pode ser quantitativa ou semiquantitativa, utilizando o método descrito por Cleri ou Maki, respectivamente (Cleri, 1980; Maki, 1977). A interpretação é feita por meio da contagem de colônias do isolado, sendo que o isolamento de > 1000 UFC/mL na cultura quantitativa e > 15 UFC/mL na semiquantitativa, é sugestiva de que o cateter seja a fonte de infecção da corrente sanguínea.
- **Infecção do cateter de longa duração:** o diagnóstico pode ser feito por meio da cultura do sítio de inserção e do *hub* do cateter. Pode ser feita também a cultura do segmento subcutâneo, mas só é realizada após a indicação clínica e retirada do porte. Deve ser evitada a contaminação do cateter durante sua retirada, sendo necessário que o procedimento seja realizado em condições totalmente assépticas. Após a retirada, o segmento subcutâneo do cateter deve ser colocado em frasco estéril e encaminhado rapidamente ao laboratório. A interpretação do resultado é feita de acordo com a amostra clínica e a metodologia utilizada. A colonização é definida

como a presença de ≥ 15 UFC por placa e ≥ 100 UFC por placa, pelos métodos de rolamento e sonicação, respectivamente. Semiquantitativo com crescimento de < 15 UFC por placa do mesmo agente em ambas as culturas da secreção do sítio de inserção e do *hub* do cateter é indicativo de que a infecção da corrente sanguínea não está relacionada ao cateter.

ACEITABILIDADE E REJEIÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS

O recebimento criterioso das amostras clínicas pelo laboratório de microbiologia é fundamental e garante melhor correlação clínico-laboratorial. Deste modo, devem existir normas para aceitar ou rejeitar determinados materiais e condições que, quando detectados, tornam necessário o contato com o médico solicitante para melhores esclarecimentos, ou solicitação de nova amostra dentro dos critérios de aceitação.

Critérios de aceitabilidade da amostra

- Amostras identificadas adequadamente, relacionadas com o pedido médico.
- Amostras coletadas e transportadas seguindo rigorosamente os critérios de orientação do laboratório.
- Amostras recentemente coletadas.

Critérios de rejeição da amostra

- Erros na identificação.
- Amostras identificadas inadequadamente.
- Discrepância entre a identificação da amostra e o pedido médico.
- Falta de identificação da amostra.
- Origem da amostra ou tipo de amostra não identificada.
- Teste a ser realizado não especificado.
- Amostras coletadas em frascos ou meio de transportes inadequados para o exame solicitado.
- Amostras obtidas durante 24 horas, pois estas estão sujeitas à contaminação em virtude da multiplicação de micro-organismos menos exigentes contidos na amostra, o que pode induzir a resultados errôneos.
- Amostras coletadas e transportadas tardiamente ao laboratório, mesmo em meios de transportes, pois estes mantêm as amostras apenas por 6 a 8 horas.
- Material conservado inadequadamente.
- Ponta de cateter de Foley.
- Ponta de cateter em solução salina ou meio de transporte.

- Material de colostomia; material de debridamento.
- Mais de uma amostra colhida no mesmo dia e do mesmo sítio. Exceção: hemocultura.
- Amostras contidas em formalina.

BIBLIOGRAFIA

1. Garcia LS et al. Catheter tip cultures. In: Clinical microbiology procedures Handbook. Section 3 (3.6), 2010.
2. Guembe M et al. how should long term tunneled central venous catheters be managed in microbiology laboratories in order to provide an accurate diagnosis of colonization? J Clin Microbiol 2012;50(3):1003-7.
3. Guembe M et al. value of superficial cultures for prediction of catheter-related bloodstream infection in long-term catheters a prospective study. J Clin Microbiol 2013;51(9):3025-30.
4. Leonard AM et al. Guidelines for Intravascular Cather-Related Infections. 2009;49(1 jul):01-45.
5. Linscott AJ. Specimen collection, transport, and acceptability. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook Section 3 (3.6), 2010.
6. Santos ACRB, Levy CE. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. In: Von Nowakonsky A et al. Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final. ANVISA. Maio/2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Assunto+de+Interesse/Aulas+Cursos+Cartazes+Publicacoes+e+Seminarios/Controle+de+Infeccao+em+Servicos+de+Saude/Manuais/Manual+de+Microbiologia+Clinica+para+o+Control+e+de+Infeccao+Relacionada+a+Assistencia+a+Saude>.
7. Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da Educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 4, 1996, Recife. Anais Eletrônicos ... Recife: UFPE; 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm> . Acessado em: 21 jan 1997.

3.5. Cultura de fungos

O **PRINCIPAL OBJETIVO** do laboratório de micologia clínica é o isolamento e a correta identificação dos fungos patogênicos. A coleta adequada, o transporte, o processamento e o cultivo das amostras clínicas são etapas essenciais para que esse objetivo seja alcançado. Os profissionais do laboratório clínico devem ter conhecimento sobre os critérios de obtenção da amostra a fim de obterem os melhores resultados que correlacionem com a suspeita clínica.

Tabela 1 Tipos de amostras clínicas indicadas para a cultura de fungos

| Micoses | | Tipos de amostra clínica |
|----------------------|-----------------------|---|
| Micoses superficiais | Ptiríase versicolor | Raspados |
| | <i>Tinea nigra</i> | Raspados cutâneos |
| | <i>Piedra</i> | Fios de cabelo cortados |
| Micoses cutâneas | <i>Tinea capitis</i> | Fios de cabelo arrancados com o bulbo capilar |
| | <i>Tinea corporis</i> | Raspados cutâneos |
| | Onicomicose | Raspados ungueais |
| | Candidíase | Raspados de pele, unha, mucocutâneos, <i>swabs</i> vaginais |

(continua)

Tabela 1 Tipos de amostras clínicas indicadas para a cultura de fungos (continuação)

| Micoses | Tipos de amostra clínica | |
|-----------------------------------|---|---|
| Micoses subcutâneas | Cromoblastomicose | Exsudatos ou raspados de lesões |
| | Micetoma | Secreções purulentas drenadas, fluidos aspirados, biópsias |
| | Feo-hifomicose | Escarro, lavado brônquico, fluidos corpóreos, secreções purulentas, raspados de córnea |
| | Esporotricose | Secreções purulentas de lesões, fluidos obtidos por aspiração |
| | Fungos leveduriformes – candidíase | Escarro, lavado brônquico, biópsias, liquor, urina, sangue |
| | Fungos leveduriformes – criptococose | Liquor, escarro, sangue, aspirado de medula, urina, raspados de lesões cutâneas, secreções de abscessos e trato sinusal |
| | Fungos leveduriformes – geotricose | Escarro, lavado brônquico |
| | Fungos dimórficos – blastomicoses | Raspados dos bordos das lesões, secreções purulentas de abscessos e do trato sinusal, urina, escarro, lavado brônquico |
| | Fungos dimórficos – paracoccidiodomicose | Raspados dos bordos das lesões, membranas mucosas, biópsias de linfonodos, escarro, lavado brônquico |
| | Fungos dimórficos – coccidiodomicose | Escarro, lavado brônquico, liquor, urina, raspados de lesões, secreções purulentas do trato sinusal e de abscessos |
| Fungos dimórficos – histoplasmose | Sangue, aspirado de medula, escarro, lavado brônquico, liquor, secreção purulenta do trato sinusal ou úlcera, raspados de lesão | |

(continua)

Tabela 1 Tipos de amostras clínicas indicadas para a cultura de fungos (continuação)

| Micoses | | Tipos de amostra clínica |
|----------|------------------|--|
| Diversas | Aspergilose | Escarro, lavado brônquico |
| | Zigomicose | Escarro, lavado brônquico, biópsias |
| | Hialo-hifomicose | Escarro, lavado brônquico, raspados ungueais, sangue, líquidos corpóreos, secreções purulentas e raspados de feridas |
| | Otite externa | Escamações epiteliais e detritos |

CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOSSEGURANÇA

Toda amostra processada em micologia deve ser considerada potencialmente patogênica, devendo ser manipulada em uma cabine de segurança biológica. Para fungos filamentosos observados em crescimentos bacteriológicos usuais, as placas devem ser seladas com película Parafilm M® para prevenir a contaminação acidental com esporos potencialmente infectantes.

SELEÇÃO, COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS PARA CULTURA DE FUNGOS

Amostras cutâneas

Amostras de pele e unhas devem ser obtidas por raspagem e acondicionadas em frascos estéreis ou em envelopes adequados para exame micológico, feitos de papel cartonado preto, maleável, com bordos contendo abas dobrantes autadesivas para posterior fechamento do envelope. Para a coleta de amostras cutâneas, é feita uma limpeza prévia do sítio de coleta com álcool 70%, e as áreas ativas e periféricas da lesão devem ser raspadas com auxílio da lâmina de um bisturi, a fim de serem obtidas escamações. Na suspeita de onicomicose, a região ungueal deve ser limpa com álcool 70% e posteriormente raspada nas camadas mais profundas para obtenção de tecido ungueal invadido por fungos. Amostras de couro cabeludo e cabelos são representativas quando obtidas as partes basais do folículo capilar infectado. Pode ser utilizada uma lâmpada de Wood em quarto escuro (lâmpada ultravioleta de 365 nm) para a localização de áreas potencialmente infectadas por dermatófitos que fluorescem na presença da luz ultravioleta. Os fios fluorescentes, distorcidos ou quebradiços devem ser selecionados para cultivo.

Aspirado de medula óssea

Amostras recebidas em seringas heparinizadas devem ser inoculadas diretamente em meios apropriados para cultura de fungos. É indicada a coleta de aspirados de medula óssea em frascos de coleta pediátricos de sistemas automatizados de hemocultura, em que a proporção amostra/caldo é ideal.

Aspirados, exsudatos, secreções purulentas

Aspirados, secreções purulentas em geral e exsudatos devem ser obtidos por aspiração em seringa e transferidas para frascos estéreis. No laboratório, devem ser examinadas em microscopia direta quanto à presença de grânulos e inoculadas em meios de cultura para fungos.

Sangue

Podem ser utilizados métodos automatizados de monitoramento contínuo para cultivo de fungos em amostras de sangue (BACTEC® – Becton Dickinson, Sparks, MD ou BacT/Alert® – bioMérieux, Durham, NC) ou ainda sistemas de lise centrifugação (ISOLATOR® – Wampole Laboratories – Cranbury, NJ) e métodos manuais (cultivos bifásicos – meio líquido e sólido).

Escarro

O escarro deve ser colhido preferencialmente pela manhã, quando a expectoração é produtiva, após a higiene bucal habitual do paciente (escovação dental). A amostra deve ser obtida em frasco estéril.

Fezes

Em geral, amostras de fezes não apresentam muita utilidade clínica no diagnóstico laboratorial, entretanto, o crescimento abundante e predominante de leveduras pode ter significado ou é indicativo de ausência de flora fecal normal. A colonização por leveduras é comum tanto em indivíduos saudáveis como em imunocomprometidos. Na suspeita de infecções fúngicas do trato gastrointestinal, indica-se a obtenção de fragmentos de biópsia e tecidos.

Líquidos pleural, peritoneal e sinovial

É indicada a coleta em frascos para cultura para fungos de sistemas automatizados (p.ex., Frasco Myco F/Lytic Becton Dickinson) ou sistemas de lise centrifugação (ISOLATOR, Wampole Laboratories). Para outros tipos de coleta,

obter a amostra em frasco estéril, centrifugar a $2.000 \times g$ por 10 minutos e inocular o sedimento em meios de cultura para fungos.

Liquor

O liquor deve ser centrifugado a $2.000 \times g$ por 10 minutos e o sedimento, ser inoculado nos meios de cultura para fungos. Caso um volume inferior a 2 mL seja recebido no laboratório, inocular diretamente nos meios, sem centrifugação.

Tecidos

Tecidos devem ser fragmentados em pequenas porções com bisturi estéril ou triturados com adição de pequenos volumes de solução salina estéril. Na suspeita de infecções por zigomicetos, os tecidos devem ser fragmentados em pequenas porções, nunca triturados e homogeneizados, uma vez que a trituração destrói as hifas e diminui a viabilidade desse grupo de fungos.

Urina

A amostra indicada para cultura de fungos é a urina de jato médio, salvo outra suspeita ou indicação clínica, devendo ser colhida em frasco estéril. É importante ressaltar que a presença de leveduras na urina pode ser um sinal indicativo da sua disseminação em pacientes imunossuprimidos, o que pode preceder candidemia.

Tabela 2 Procedimentos para coleta e transporte das amostras clínicas para cultura de fungos

| Tipo de amostra | Procedimentos para coleta e transporte |
|-------------------------------------|---|
| Secreção de abscessos ou de feridas | Obter a amostra por aspiração e transferir para frasco estéril |
| Sangue Aspirado de medula | Colher a amostra preferencialmente em frasco para sistema automatizado de hemocultura (p.ex., BACTEC® – Becton Dickinson ou BacT/Alert® bioMérieux) |
| Ponta de cateter | Colocar 5 cm da parte distal do cateter em frasco estéril de boca larga |

(continua)

Tabela 2 Procedimentos para coleta e transporte das amostras clínicas para cultura de fungos (continuação)

| Tipo de amostra | Procedimentos para coleta e transporte |
|---|--|
| Raspado de córnea | Inocular diretamente após a coleta em meios de cultura apropriados. O médico deve contatar o laboratório previamente à coleta solicitando os meios para proceder atividade diretamente no consultório |
| Secreção conjuntival | Colher em <i>swab</i> com meio de transporte de Stuart previamente à aplicação de anestésicos |
| Fluido intraocular | Obter a amostra em frasco estéril |
| Raspados cutâneos (pele, áreas interdigitais) Raspados ungueais Cabelos | Após selecionar a área infectada, promover raspagem do material cutâneo ou ungueal e enviar em frasco estéril. Para amostras de cabelo, obter os fios inteiros, contendo o bulbo, e encaminhar em frasco estéril Para reduzir a contaminação bacteriana das áreas da pele, indica-se, sempre que possível, descontaminação prévia com álcool 70% |
| Amostras respiratórias | Escarro obtido por expectoração profunda e transferido para frasco estéril, de boca larga; lavado broncoalveolar; aspirado transtraqueal; escovado brônquico (todas as amostras colhidas e transportadas em frasco estéril) |
| Fluidos estéreis (liquor, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido sinovial, líquido peritoneal) | Colher no mínimo 2 mL em frasco estéril |
| Tecidos, biópsias | Obter fragmentos de tecido ou biópsias e enviar em frasco estéril contendo solução salina não bacteriostática para prevenir ressecamento. Não são aceitáveis para cultura de fungos amostras enviadas em formol |
| Urina | Amostra obtida em frasco estéril, preferencialmente a primeira da manhã ou urina colhida através de cateter ou urina colhida após massagem prostática Não são indicadas para cultura de fungos: urina colhida com cateter de Foley ou urina de 24 horas |

TRANSPORTE DE AMOSTRAS PARA CULTURA DE FUNGOS

As amostras devem ser colhidas e transportadas para o laboratório preferencialmente em temperatura ambiente (15 a 30°C) em até 2 horas após a coleta. Em caso de demora, é indicada refrigeração (2 a 8°C), entretanto devem ser consultados os critérios de exceção para outros setores do laboratório de microbiologia, uma vez que as amostras clínicas costumam ser compartilhadas entre os departamentos.

CADASTRAMENTO DA AMOSTRA

Os dados demográficos do paciente e os detalhes referentes à amostra e ao sítio de infecção têm fundamental importância para o diagnóstico microbiológico das infecções causadas por fungos. O cadastramento laboratorial dos dados do paciente e da amostra deve conter, no mínimo, as seguintes informações:

- Identificação do paciente, sexo, idade, localização (ambulatorial, internado).
- Indicação ou suspeita clínica.
- Tipo de amostra clínica, sítio e topografia da coleta.
- Uso atual ou prévio de medicamentos, antimicrobianos e antifúngicos.

CRITÉRIOS DE ACEITABILIDADE

- Coleta asséptica, em frascos estéreis, a prova de vazamentos.
- Entrega ao laboratório em prazos estabelecidos (o transporte no tempo apropriado definido para cada amostra é crítico para garantir a sobrevivência e o isolamento de organismos fastidiosos e prevenir o supercrescimento de bactérias).
- Volumes mínimos de amostra para evitar índices de resultados falso-negativos e aumentar as chances de isolamento de organismos a partir de líquidos estéreis. Caso os volumes recebidos pelo laboratório não sejam adequados, o médico solicitante deve ser imediatamente contatado pelo laboratório para eleger os testes laboratoriais que serão prioritários em tal amostra.
- Em geral, a obtenção de *swabs* de feridas abertas não é recomendada para culturas de fungos por carrear micro-organismos da flora saprófita local.
- Sempre que possível, obter amostras antes do uso de agentes antifúngicos.
- Compatibilidade de dados entre a identificação primária da amostra, a requisição médica que acompanha a amostra e a identificação do laboratório: qualquer discrepância observada na identificação da amostra deve ser cuidadosamente verificada antes do processamento da cultura de fungos para evitar erros na fase pré-analítica que possam comprometer o resultado do exame.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA EXAME MICROSCÓPICO DIRETO

Uma amostra encaminhada para o cultivo em micologia pode ser examinada em microscopia direta quanto à presença de estruturas fúngicas, sendo uma análise complementar, e nunca substitutiva à cultura. O exame direto é uma análise primária da amostra, que pode fornecer ao médico-assistente informações preliminares que contribuem para o início do tratamento, podendo ajudar na determinação do significado do micro-organismo que virá a ser isolado na cultura.

Os métodos de exame microscópico direto de amostras em micologia são:

- Preparo e clarificação em KOH.
- Pesquisa direta para *Cryptococcus*.
- Colorações.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA CULTURA DE FUNGOS

As amostras para cultivos em micologia devem ser inoculadas em meios combinados que garantam o crescimento de todos os agentes de significado clínico. Há uma variedade de combinações que podem ser usadas e, em geral, a escolha do conjunto de meios depende de fatores como o perfil de pacientes e de agentes fúngicos mais prevalentes e endêmicos na área, o custo, a disponibilidade e a preferência de cada laboratório. Em todos os casos, alguns fatores devem ser considerados e uma complementariedade entre os meios deve ser garantida da seguinte maneira:

- Adição de cloranfenicol e/ou gentamicina na formulação dos meios de cultura para inibir a contaminação bacteriana.
- Incorporar a ciclo-hexamida ao meio de cultura para inibir o crescimento de fungos saprófitas de crescimento rápido que possam atrapalhar o surgimento de patógenos importantes e de crescimento mais lento. Será necessário, ao mesmo tempo, utilizar meio de cultura sem ciclo-hexamida. Deve ser ressaltado que a ciclo-hexamida inibe o crescimento de fungos patogênicos importantes, como *Cryptococcus neoformans/gattii*, *Penicillium marneffeii*, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium prolificans*, algumas espécies de *Candida* e zigomicetos.

- Recomenda-se o uso de um meio de enriquecimento para garantir o crescimento de fungos fastidiosos e dimórficos.

A temperatura para incubação e crescimento dos fungos clinicamente relevantes é de 30°C. Se não for possível disponibilizar uma estufa para incubação a 30°C, indica-se a incubação dos meios em temperatura ambiente (aproximadamente a 25°C). Não há nenhuma vantagem adicional em incubar culturas primárias rotineiramente também entre 35 e 37°C; isso deve ser feito apenas em casos específicos, em que a suspeita de fungos dimórficos é levantada.

A maioria das culturas deve ser mantida por um período máximo de incubação de 4 semanas, exceto culturas de orofaringe, secreção vaginal e urina ou culturas em meios cromogênicos, que podem ser liberadas em 48 horas. Para cultivos com suspeita indicativa de fungos dimórficos, recomenda-se incubação estendida para até 8 semanas antes de ser liberado um resultado negativo para crescimento de fungos.

BIBLIOGRAFIA

1. Adelaide Mycology Online. Disponível em: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>.
2. Doctor Fungus. Disponível em: <http://www.doctorfungus.org/>.
3. Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 5.ed. Washington: ASM Press, 2011.
4. Zaitz C, Ruiz LRB, Souza VM. Atlas de micologia médica. Diagnóstico laboratorial. 2.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004.

3.6. Cultura para *Candida*

A **INCIDÊNCIA DE** infecções fúngicas vem aumentando progressivamente a partir da década de 1980. Paradoxalmente, o aparecimento de doenças imunossupressoras e a evolução da medicina trouxe um número crescente de procedimentos invasivos, terapias imunossupressoras agressivas, uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro, nutrição parenteral e estadia hospitalar prolongada, fatores que permitiram que os fungos emergissem como causadores de infecções graves em seres humanos.

Entre as infecções causadas por fungos, as leveduras são muito relevantes, principalmente no ambiente hospitalar. As espécies de *Candida* são as leveduras patogênicas mais importantes e frequentes. Nos Estados Unidos, são a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, com a *Candida albicans* sendo responsável por mais de 50% das infecções, seguida pela *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*.

FATORES DE RISCO

Se o indivíduo não apresentar nenhum tipo de imunodepressão, as infecções por *Candida* tendem a ser limitadas em extensão e gravidade. As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal, de mucosas e da pele; assim, o uso de antimicrobiano de amplo espectro quebra o equilíbrio da microbiota da cavidade oral e do trato gastrointestinal ao eliminar a população competitiva predominante. Quando o indivíduo apresenta qualquer tipo de imunodepressão, a infecção pode ser grave e invasiva. Diabete, terapias imunossupressoras ou quimioterapias em altas doses também são fatores de risco. Infecções de corrente sanguínea podem ser ocasionadas pelo

uso prolongado de dispositivos vasculares, prática comum no tratamento de pacientes hospitalizados.

TIPOS DE INFECÇÕES

Infecção cutânea

É o tipo de infecção mais frequentemente causada por espécies de *Candida*. Apresenta-se como lesões eritematosas acompanhadas ou não de um exsudato esbranquiçado cremoso ou descamação. Em áreas sujeitas a atrito, sob efeito de calor e umidade, pequenas fissuras podem servir como porta de entrada para infecção por *Candida*. Os locais mais comuns são virilha, entre os dedos das mãos e dos pés, sob as mamas e axilas. Onicomicoses (acometimento das unhas) e paroníquia (acometimento do leito ungueal) são frequentes em indivíduos que lidam com água ou umidade por tempo prolongado.

Para uma boa sensibilidade no resgate do micro-organismo, a coleta do material tem grande valor, sendo diretamente responsável pelo crescimento da levedura. Dessa maneira, é fundamental considerar:

- O material coletado deve ser verdadeiramente representativo da lesão.
- É importante descrever se a pele está íntegra ou ulcerada.
- Coletar preferencialmente raspado das margens e base da lesão, já que são os locais onde as leveduras estão viáveis.
- Não é recomendado cultura de lesões secas ou crostas.

Coleta de lesões superficiais

- Limpar a superfície cutânea com água destilada ou soro fisiológico estéril; não utilizar iodo.
- Para amostras de pele, usando um bisturi pequeno estéril, raspar cuidadosamente as bordas da lesão.
- Para amostras de couro cabeludo, incluir alguns fios de cabelo para exame.
- Para amostras de unha, obter raspado e/ou material abaixo da unha. Com a ajuda de um bisturi estéril pequeno, raspar cuidadosamente a unha até atingir o leito ungueal para a obtenção de micro-organismos viáveis.

Os materiais obtidos podem ser colocados em placas de Petri estéreis e devem ser identificados separadamente para cada sítio a ser identificado (p.ex., raspado da unha do segundo dedo da mão direita, raspado da região lateral do pé esquerdo, raspado da região central do antebraço direito, etc.).

Transporte

A placa de Petri deve ser transportada em temperatura ambiente (20 a 25°C) até 30 minutos após a coleta.

Reporte do resultado

- Cultura negativa: não houve crescimento de *Candida* spp na amostra analisada.
- Cultura positiva: identificar no laudo do exame a espécie de *Candida* isolada.

Candidíase oral

Manifesta-se por placas cremosas esbranquiçadas na mucosa oral. Os sintomas geralmente não são exuberantes e podem iniciar com fissuras nos cantos da boca, porém, quando a infecção é maciça, pode resultar em disfagia. A candidíase oral ocorre frequentemente em crianças e é uma das infecções iniciais nos pacientes infectados pelo HIV. A candidíase oral geralmente é causada pela *Candida albicans*, mas outras espécies também podem causá-la.

Coleta

- Solicitar ao paciente que abra bem a boca.
- Procurar uma área esbranquiçada e coletar a amostra da lesão com *swab*.
- Introduzir o *swab* em um tubo com solução salina estéril.

Transporte

O material deve ser transportado em temperatura ambiente (20 a 25°C) até 30 minutos após a coleta.

Reporte do resultado

- Cultura negativa: não houve crescimento de *Candida* spp na amostra analisada.
- Cultura positiva: identificar no laudo do exame a espécie de *Candida* isolada.

Candidíase esofágica

Ocorre sob a forma de lesões erosivas recobertas por placas esbranquiçadas no esôfago resultando em dor retroesternal com piora à deglutição.

Coleta

O material das lesões pode ser coletado via endoscopia digestiva por meio de escovado ou biópsia.

Transporte

O material deve ser transportado em temperatura ambiente (20 a 25°C) até 30 minutos após a coleta.

Reporte do resultado

- Cultura negativa: não houve crescimento de *Candida* spp na amostra analisada.
- Cultura positiva: identificar no laudo do exame a espécie de *Candida* isolada.

Candidíase vaginal

A candidíase vaginal ocorre em mulheres pós-puberais e manifesta-se com hiperemia local, placas esbranquiçadas no canal vaginal, queimação e prurido perivaginal, dispareunia e corrimento espesso com aparência de leite coagulado. Diabetes, antibioticoterapia, gravidez e atividade sexual são fatores que predis põem esse tipo de infecção.

Coleta

Para a coleta, recomenda-se à paciente não estar em período menstrual, evitar ducha e cremes vaginais na véspera da coleta e estar em abstinência sexual por 3 dias.

Coleta vaginal

- Inserir um espéculo (sem lubrificante; usar água morna) na vagina.
- Retirar o excesso de muco cervical com *swab* de algodão.
- Inserir o *swab* do meio de transporte, rodar por alguns segundos sobre o fundo do saco, retirar e voltá-lo no meio de transporte para cultura de fungos.

Transporte

O material deve ser transportado em temperatura ambiente (20 a 25°C) até 12 horas após a coleta.

Reporte do resultado

- Cultura negativa: não houve crescimento de *Candida* spp na amostra analisada.
- Cultura positiva: identificar no laudo do exame a espécie de *Candida* isolada.

Caso não tenham sido pesquisadas somente leveduras, reportar os outros agentes identificados.

Infecções do trato urinário

É muito difícil diagnosticar uma infecção do trato urinário causada por *Candida* spp, pois estas leveduras são colonizantes do canal vaginal e também fazem parte da flora da bexiga de pacientes com sonda de demora, principalmente quando estão em uso de antibioticoterapia sistêmica.

Coleta

A coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente na primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de 2 a 3 horas.

O primeiro jato de urina deve ser desprezado no vaso sanitário. Colher o jato médio urinário no frasco universal de boca larga fornecido pelo laboratório. Colher um pouco mais da metade do frasco e evitar enchê-lo.

Pacientes com sondagem vesical

Colher a urina puncionando-se o catéter na proximidade da junção com o tubo de drenagem. Não colher a urina da bolsa coletora. No pedido laboratorial deve constar que o paciente está cateterizado.

Consultar o capítulo 3.1. Urocultura para a descrição detalhada dos procedimentos.

Transporte

O processamento laboratorial deve ser feito dentro de 2 horas. Caso não seja possível, as amostras devem ser refrigeradas a 4°C até o momento da semeadura (no máximo de 24 horas).

Reporte do resultado

- Cultura negativa: não houve crescimento de *Candida* spp na amostra analisada.
- Cultura positiva: identificar no laudo do exame a espécie de *Candida* isolada.

Caso não tenham sido pesquisadas somente leveduras, reportar os outros agentes identificados.

Candidíase invasiva/candidemia

A maioria das infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* resulta de invasão da corrente sanguínea e disseminação hematogênica da levedura. Candidemia é definida com o isolamento de *Candida* spp de pelo menos uma amostra de sangue cultivada (hemocultura). Candidíase invasiva primária em

órgão profundo é frequente após cirurgia abdominal, pois pode haver contaminação da cavidade peritoneal com leveduras da flora intestinal.

Coleta de hemocultura – procedimento

- Lavar as mãos e secá-las.
- Remover os selos da tampa dos frascos de hemocultura e fazer assepsia prévia nas tampas com álcool 70%.
- Garrotear o braço do paciente e selecionar uma veia adequada. Essa área não deve mais ser tocada.
- Fazer a antissepsia com álcool 70% de forma circular e de dentro para fora por 2 vezes.
- Coletar a quantidade de sangue e o número de amostras recomendados de acordo com as orientações descritas ou conforme discriminados no pedido médico.
- Identificar cada frasco com todas as informações padronizadas e enviar ao laboratório juntamente com a solicitação médica devidamente preenchida.

Observações:

- Colher antes da administração de antibiótico.
- A coleta com cateteres não é recomendada quando se podem utilizar punções venosas.
- Punções arteriais não trazem benefícios na recuperação dos micro-organismos.
- Não se recomenda a troca de agulhas entre a punção de coleta e a distribuição do sangue no frasco de hemocultura.
- Método de coleta do sangue e volume coletado influenciam diretamente no sucesso da recuperação de micro-organismos e interpretação adequada dos resultados.
- Lembrar que algumas espécies de *Candida* fazem parte da flora normal da pele; se a antissepsia não for adequada, pode haver crescimento de *Candida* na hemocultura e conseqüentemente tratamento equivocado ao paciente.

Consultar o capítulo 3.2. Hemocultura para a descrição detalhada do procedimento de coleta.

Transporte

Nunca refrigerar o frasco. Manter o frasco em temperatura ambiente e encaminhar o mais rápido possível para o laboratório.

Reporte do resultado

- Cultura negativa: não houve crescimento de *Candida* spp na amostra analisada.
- Cultura positiva: identificar no laudo do exame a espécie de *Candida* isolada.

BIBLIOGRAFIA

1. McPherson RA, Pincus MR. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 21.ed. Barueri: Manole, 2012. p.1248-9.
2. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
3. Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica. Módulo III. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
4. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica. Barueri: Minha Editora, 2014.

3.7. Cultura de liquor

CONSIDERANDO-SE QUE O liquor é uma amostra nobre de difícil obtenção, recomenda-se que haja rigor especial em todas as fases de um procedimento associado a esse material.

A cultura do liquor é direcionada principalmente ao isolamento de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas, fungos e micobactérias.

FASE PRÉ-ANALÍTICA – COLETA, TRANSPORTE, CADASTRAMENTO DA AMOSTRA, CRITÉRIOS DE ACEITABILIDADE DA AMOSTRA

Os requisitos da fase pré-analítica para a cultura geral incluem:

- **Cadastramento adequado da amostra:** etapa inicial e inclui, além do nome do paciente, data e hora da coleta, números de registro e identificação que permitam rastreabilidade.
- **Volume:** o ideal é superior a 1 mL. Volumes maiores (5 a 10 mL) aumentam a sensibilidade da cultura e são recomendados para a recuperação de micobactérias e fungos.
- **Acondicionamento:** em frasco estéril que não provoque aerossóis quando for aberto.
- **Transporte:** em temperatura ambiente, entre 20 e 35°C. A amostra não deve ser exposta a refrigeração e nem a calor ou frio excessivos. Deve ser enviada em até 1 hora ao laboratório, a fim de ser processada o mais rapidamente possível.

O fato de a temperatura de transporte ser ambiente é um fator crítico; é recomendada e admitida a refrigeração do liquor apenas nos casos em que ele será processado por métodos moleculares.

De acordo com a literatura, quando há requisição de coleta de liquor, seria ideal a coleta de pelo menos três tubos, a fim de que o liquor possa ser analisado pelo setor de bioquímica, hematologia e microbiologia. Quando não há indicação específica no pedido, o tubo 1 deve seguir para a bioquímica (não é o indicado para a cultura, pois é aquele que tem mais chance de contaminação); o tubo 2, para microbiologia e testes sorológicos; o tubo 3, para hematologia; e outros tubos, para demais procedimentos. Quando essa rotina não é seguida, é imperativo que um tubo seja enviado inicialmente à microbiologia, para que a amostra possa ser processada de forma estéril.

De preferência, a amostra deve ser colhida antes da antibioticoterapia.

PROCESSAMENTO

Amostras com volume superior a 1 mL devem ser centrifugadas (de preferência, com o uso de citocentrífuga) e o sedimento deve ser utilizado para realização de bacterioscopia e semeadura, enquanto o sobrenadante é destinado à realização das provas de detecção de antígenos bacterianos.

De acordo com as características especiais dessa amostra, já abordadas anteriormente, trata-se de material que deve ser aceito até com volume inferior ao recomendado e, nesse caso, deve-se priorizar o número de testes que será realizado. Outro ponto importante é incluir obrigatoriamente uma nota no final do laudo documentando que a coleta de volume foi inferior ao preconizado.

CULTURA GERAL (AERÓBIA)

Para cultura geral, utilizam-se ágar sangue e ágar chocolate incubados por até 48 horas em temperatura de 35 a 37°C, em atmosfera de 5 a 10% de CO₂, que permitem o isolamento de patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (hoje mais dificilmente isolado) e enterobactérias, entre outros. Para *Listeria monocytogenes*, uma vez que a temperatura de incubação de 4°C é preferencial para seu crescimento, pelo menos em crianças abaixo de 1 ano, deve-se considerar incluir uma placa suplementar de ágar sangue.

A cultura do liquor deve ser acompanhada de bacterioscopia da amostra; esse procedimento tem especificidade acima de 97% e sensibilidade que varia de 25% (para concentrações de bactéria 10³ UFC/mL) a 97% (para concentra-

ções de bactéria > 10⁵ UFC/mL). A probabilidade de visualizar bactérias pode ser aumentada com o uso de citocentrífuga. O uso prévio de antimicrobianos e a espécie do micro-organismo também estão relacionados com a positividade do esfregaço. Por outro lado, resultados falso-positivos podem ocorrer, sendo atribuídos principalmente a contaminação do corante e erro de interpretação do observador.

Apesar de questionável, a cultura também pode ser acompanhada da pesquisa de antígenos bacterianos. Este teste não é superior à bacterioscopia e pode ter resultados falso-positivos que levam a terapêutica e hospitalização inadequadas, mas pode auxiliar como teste rápido de detecção de patógenos em meningite aguda bacteriana e na análise de consistência da cultura. Sua melhor indicação é para pacientes em uso de antibioticoterapia e com bacterioscopia negativa. Existem vários *kits* comerciais com essa finalidade e que têm como princípio a aglutinação com látex. As vantagens do teste incluem rapidez e facilidade de realização, além de não utilizar equipamento especial. A sensibilidade também é variável de acordo com o agente, sendo de 67 a 100% para *S. pneumoniae*, 50 a 93% para *N. meningitidis* e 69 a 100% para *Streptococcus agalactiae*. De qualquer maneira, um teste negativo não afasta infecção.

Para cultura de micobactérias, a coleta de volume superior a 5 mL está associada a melhor sensibilidade do teste. Se a solicitação for exclusiva para esse grupo de micro-organismos, podem-se aceitar até 2 horas como prazo de recebimento da amostra.

A semeadura deve ser feita em meio sólido (Lowenstein-Jensen) e meio líquido, podendo ser considerado o uso dos frascos utilizados nos equipamentos automatizados de hemocultura, como o BACTEC (BD) e BactAlert (bioMérieux) e o caldo MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube/ BD), para ser utilizado de forma manual ou com a linha de equipamentos BACTEC™ MGIT TB System. A pesquisa direta, por meio da coloração de Ziehl-Neelsen, também deve acompanhar esse procedimento.

Pode ainda ser feita a cultura para fungos, que visa a isolar principalmente *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Candida* spp em pacientes hospitalizados.

Os meios de cultura recomendados são o ágar Sabouraud e Mycosel com tubos incubados a temperatura ambiente e a temperatura entre 35 e 37°C. O período de incubação dessas culturas é de até 21 dias. Para o rápido diagnóstico de *Cryptococcus neoformans*, podem-se utilizar também a coloração de tinta da China e a detecção de antígenos por meio de partículas impregnadas com

látex. Esse teste no liquor é mais sensível do que no soro; tem sensibilidade e especificidade acima de 90%, porém pode ter resultados falso-positivos e falso-negativos em pacientes HIV positivos, por exemplo.

A indicação de cultura anaeróbia do liquor é uma situação de exceção e está associada principalmente à hipótese diagnóstica de empiemas e abscessos associados ao sistema nervoso central.

Ainda, como complementar à cultura do liquor, tem-se a detecção do perfil de sensibilidade.

Os aspectos gerais desse procedimento são abordados em outro capítulo, mas seguem adiante algumas observações específicas para isolados de cultura do liquor:

- *Streptococcus pneumoniae*: penicilina e cefotaxime, ceftriaxone ou meropeném devem ser testados por um método que determine concentração inibitória mínima (CIM) e reportados rotineiramente. Para vancomicina, são aceitáveis a disco-difusão ou método que determine CIM. Existem critérios específicos de leitura para interpretação de cefotaxime e ceftriaxone em isolados do liquor.
- *Haemophilus influenzae*: reportar somente ampicilina, cefalosporina de terceira geração, cloranfenicol e meropeném.

BIBLIOGRAFIA

1. Baron EJ et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: http://www.idsociety.org/uploadedFiles/IDSA/Guidelines-Patient_Care/PDF_Library/Laboratory%20Diagnosis%20of%20Infectious%20Diseases%20Guideline.pdf. Acessado em: 30 mar 2014.
2. Center for Disease Control and Prevention. Collection and transport of clinical specimens. Disponível em: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt05-collect-transport-specimens.html>. Acessado em: 17 abr 2014.
3. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth.
4. Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
5. Tunkel AR et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2004;39(9):1267-84.

3.8. Cultura para micobactérias

A TUBERCULOSE (TB) é, ainda nos dias de hoje, uma doença devastadora e um grande desafio de saúde pública, pois é a segunda principal causa de morte a partir de um único agente infeccioso, ficando atrás apenas do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Embora a taxa de mortalidade tenha apresentado queda de 45% de 1990 para os dias atuais, a doença acometeu 8,6 milhões de casos novos no mundo em 2012, com 1,3 milhão de mortes (deste total, 300 mil coinfectados com HIV). Estima-se que, em 2012, houve 450 mil casos de TB multirresistente (MDR-TB), ou seja, com resistência ao menos à isoniazida e à rifampicina, com 170 mil mortes. Já a tuberculose super-resistente (XDR-TB) foi detectada em pelo menos 1 caso em 92 países até o final de 2012, sendo estimado existir, em média, 9,6% dos casos de MDR-TB.

Para auxílio ao combate desse cenário, o papel do laboratório é fundamental, viabilizando um diagnóstico rápido e o mais acurado possível. Para tal, o laboratório de microbiologia tem a responsabilidade de orientar a obtenção e vigiar a qualidade das amostras biológicas, seu processo analítico, com indicadores laboratoriais, e seu transporte, a fim de viabilizar as melhores condições para o seu processamento, respeitando as medidas de biossegurança adequadas.

A TB é causada pelos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), um grupo geneticamente muito correlacionado, e inclui as espécies e subespécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis bacillus Calmette-Guérin* (BCG), *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* e *M. mungi*.

O principal agente da TB humana é o *M. tuberculosis*, enquanto *M. africanum* é mais encontrado na África. A *M. bovis* causa doença em bovinos e em

vários outros mamíferos, além de atingir também o homem. Já a *M. microti* é patogênica para roedores, a *M. caprae*, para caprinos e a *M. pinnipedii* causa infecção em leões marinhos.

As micobactérias não tuberculose (MNT) são comumente encontradas no meio ambiente e possuem patogenicidade variável conforme a espécie. As espécies potencialmente patogênicas podem causar uma variedade de doenças em humanos, que diferem em gravidade e importância em saúde pública.

É fundamental ressaltar para os laboratórios que manejam material biológico com suspeita de tuberculose e/ou cepas de micobactérias a necessidade de se adequarem às medidas de biossegurança pertinentes a cada tipo de exposição, visto que já foi demonstrada a incidência 3 vezes maior de TB em profissionais que trabalham com CMTB do que naqueles que não trabalham com esse agente, em função dos aerossóis gerados nos procedimentos laboratoriais. Para mais informações sobre esse assunto, consultar o documento “Manual de biossegurança para laboratórios da tuberculose”, da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicado em 2012.

COLETA DE AMOSTRAS

Amostras respiratórias

Escarro espontâneo

- O funcionário que acompanha a coleta, devidamente paramentado com máscara N95/PPF2, deve se certificar de que a identificação no frasco coletor está de acordo com as informações da requisição médica de baciloscopia e cultura para micobactérias.
- Caso a coleta seja domiciliar, o paciente deve receber as orientações ao retirar o recipiente de coleta no laboratório, e também deve ser orientado a escolher um local ao ar livre para a coleta; caso não esteja disponível, escolher um local ventilado, em que ele possa fazer a coleta sozinho.
- Registrar os horários de início e término do horário de coleta e anotá-los nas requisições médicas; estas devem ser mantidas longe da coleta de escarro para evitar sujidade.
- A OMS recomenda, para o diagnóstico da TB pulmonar, coletar 2 a 3 amostras de escarro com intervalo mínimo de 8 horas (preferencialmente 24 horas), com pelo menos uma das amostras coletada ao acordar, por causa da maior sensibilidade nessa amostra.
- Para a coleta, utilizar frasco plástico estéril, de boca larga e tampa rosqueável, com capacidade de 35 a 50 mL (Figura 1).



FIGURA 1 Recipiente para coleta de escarro.

Coleta

- Volume ideal – 10 mL, volume mínimo – 5 mL.
- Recomenda-se jejum de, no mínimo, 6 horas; durante o período de jejum, orienta-se ingerir o máximo de água possível, caso não haja contraindicação médica.
- Coletar o escarro logo ao acordar, sentado, antes da ingestão de alimentos e após higienização da cavidade oral (escovar os dentes, a mucosa bucal, a língua, sem pasta dental ou solução de bochecho, apenas com água filtrada). Em seguida, realizar bochecho/gargarejo com água filtrada. Caso haja prótese dentária, removê-la antes da higienização da cavidade oral. Lavar as mãos antes e depois desse procedimento.
- Tossir e expectorar o material em um recipiente estéril de boca larga (coletor universal). Evitar a coleta apenas de saliva ou de volume inferior a 5 mL. Espuma não é valorizada como volume.
- Amostras salivares e/ou com volume inferior a 5 mL não devem ser rejeitadas, mas sugere-se incluir nota no laudo, para ciência do médico-assistente da menor sensibilidade diagnóstica nesses casos.
- Não existe limite de tempo para a coleta, mas são raros os pacientes que necessitam de mais de 30 minutos para expectorar 10 mL de escarro.
- Intercorrências durante a coleta: em casos de vômito, interromper imediatamente a coleta e o pote deve ser descartado; em caso de expectoração com sangue ou hemoptise, o paciente deve ser avaliado por um médico imediatamente para verificar a necessidade de interrupção do procedimento (essa amostra não pode ser utilizada para o teste molecular rápido).

- Ao término da coleta, o paciente deve lavar as mãos, fixar a máscara no rosto e ser liberado, caso seja paciente ambulatorial.
- Colocar o pote coletor em saco plástico transparente e fechá-lo para o transporte.

Transporte e conservação pré-analítica

- Manter em temperatura ambiente até no máximo 2 horas após a coleta, em ambiente protegido de luz solar.
- Caso o intervalo entre o término da coleta de escarro e o processamento da amostra no laboratório seja superior a 2 horas, refrigerar a amostra (temperatura entre 2 e 8°C), que pode ser processada em até 7 dias.
- Transportar o pote (bem vedado) dentro de caixas térmicas com gelo seco, sob temperatura entre 2 e 8°C até o laboratório.

Critérios de rejeição

- Amostras não identificadas.
- *Pool* de escarro.

Critérios de processamento com restrição de análise

- Amostras que não obedeceram aos critérios pré-analíticos definidos.

Obs.: a coleta de escarro induzida com inalação de solução salina hipertônica estéril (5 mL NaCl 3%) deve ser desencorajada, pelo risco de broncoespasmo e por necessitar de ambiente para a coleta com pressão negativa. Por isso, caso seja opção do médico realizá-lo, este deve ser feito apenas em ambiente hospitalar, com condições de atendimento de emergência. Orientar inalação com solução salina hipertônica estéril (5 mL NaCl 3%) por no mínimo 5 minutos e no máximo 20 minutos, com os demais passos similares à coleta de escarro espontâneo. Nesses casos, anotar “escarro induzido” no pedido médico.

Secreção traqueal, lavado broncoalveolar

- Procedimentos realizados com indicação médica, com coleta realizada por equipe especializada: secreção traqueal coletada por enfermeiro e/ou fisioterapeuta e lavado broncoalveolar coletado por médico por meio de broncoscopia.
- O tempo de transporte e conservação pré-analítica são os mesmos de uma amostra de escarro.

Lavado gástrico

- Também considerado como amostra respiratória.
- É indicado para crianças que não conseguem escarrar e deglutem o escarro, sendo recomendado pelo menos duas amostras em dias consecutivos.
- Coleta realizada pela equipe de enfermagem, sob supervisão médica, com o paciente internado.

Coleta

- É feita preferencialmente assim que a criança acordar, sem comer ou levantar da cama, em jejum de 8 a 10 horas.
- Introduzir a sonda nasogástrica fina, via oral ou nasal até o estômago.
- Injetar 10 a 15 mL de solução fisiológica estéril.
- Após 30 minutos, aspirar o lavado gástrico e transferir para frasco plástico de boca larga, estéril, com tampa rosqueável.

Transporte e conservação pré-analítica

- Transporte sob refrigeração (2 a 8°C) em até 4 horas.
- Sem adição de solução neutralizante, processar a amostra preferencialmente em até 15 minutos.
- Se o tempo de transporte é maior que 1 hora, é necessário neutralizar a acidez para não inviabilizar o crescimento da micobactéria com solução neutralizante da acidez gástrica.
- Para neutralizar a amostra clínica: neutralizar o suco gástrico com carbonato de sódio 1 mg para cada 1 mL de lavado gástrico.

Amostras extrapulmonares

Liquor

- Material coletado por médico por meio de punção lombar ou de derivação ventricular, diante de suspeita de neurotuberculose.
- Coletar em tubo cônico estéril (tubo falcon de 15 mL).
- Recomenda-se volume de 4 a 5 mL de liquor, em virtude da melhor sensibilidade diagnóstica, porém deve-se processar o volume que for disponibilizado.

Transporte e conservação pré-analítica

- Transportar a amostra em temperatura ambiente o mais brevemente possível (por menos de 15 minutos) e mantê-la refrigerada (temperatura entre 2 e 8°C) em ambiente protegido da luz solar se ela não for processada em até 24 horas.

Crêterios de rejei o

- Amostras não identificadas.

Crêterios de processamento com restri o de análise

- Amostras que não obedeceram aos cr terios pr -analíticos definidos.

Líquidos cavitários (exceto liquor)

- A coleta desses líquidos orgânicos (líquido pleural, asc tico, peritoneal, sinovial)   realizada por médicos.
- Para o humor aquoso/vítreo, a coleta   realizada por médico oftalmologista e geralmente não passa de 0,5 mL.

Coleta

- Para os líquidos orgânicos em geral, coletar em tubo c nico estéril (tubo falcon de 15 ou 50 mL) ou infundir 3 a 5 mL em frasco de hemocultura específico para micobactérias.
- No geral,   recomendado volume maior ou igual a 10 mL, visando a melhor sensibilidade diagnóstica, porém deve-se processar o volume que for disponibilizado.

Transporte e conserva o pr -analítica

- Transportar a amostra em temperatura ambiente o mais brevemente possível (por menos de 15 minutos) e mantê-la refrigerada (temperatura entre 2 e 8 C) em ambiente protegido da luz solar se ela não for processada em até 24 horas.

Crêterios de rejei o

- Amostras não identificadas ou frascos rachados.

Crêterios de processamento com restri o de análise

- Amostras que não obedeceram aos cr terios pr -analíticos definidos.

Urina

- Material coletado na suspeita de TB renal, principalmente.
- Recomenda-se coleta de 3 a 5 amostras consecutivas em dias diferentes.
- Lembrar que há MNT que podem colonizar a uretra distal e, por isso, a cultura tem papel fundamental, pois viabiliza o isolamento e a identifica o da

micobactéria encontrada. Para considerar doença renal por MNT, é necessário isolar a mesma espécie em 2 amostras e correlacionar com o quadro clínico e a patogenicidade da espécie encontrada.

Coleta

- Coletar o volume total da primeira urina da manhã, sem desprezar o primeiro jato urinário, após higiene local com gaze com água e sabão neutro, em frasco estéril, com tampa rosqueável.
- Volume mínimo 40 mL.

Transporte e conservação pré-analítica

- Manter em temperatura ambiente por até 2 horas após a coleta, protegida de luz solar.
- Caso o intervalo entre o término da coleta e o processamento da amostra no laboratório seja superior a 2 horas, refrigerar a amostra (temperatura entre 2 e 8°C), que pode ser processada em até 4 horas.

Crítérios de rejeição

- Amostras não identificadas.
- Urina de 24 horas.
- Amostras de urina colhidas no mesmo dia.

Crítérios de processamento com restrição de análise

- Amostras com volume inferior ao mínimo recomendado (40 mL).
- Amostras que não obedeceram os critérios pré-analíticos definidos.

Biópsias, fragmentos ósseos, de partes moles, aspirados de gânglios ou abscessos e secreções purulentas

- Em casos de materiais pós-cirúrgicos, principalmente cirurgias estéticas, com suspeitas de infecção por MNT de crescimento rápido, orientar sinalização no pedido médico.
- Amostras de raspado de pele devem ser desencorajadas, sendo indicada coleta de pele com biópsias.

Coleta

- Amostras devem ser coletadas pela equipe médica de modo asséptico e colocadas em frasco estéril com algumas gotas de solução fisiológica estéril.

- Não coletar com *swab*, pois pode conter substâncias que inibem o crescimento de micobactérias.

Transporte e conservação pré-analítica

- Manter em temperatura ambiente por até 2 horas da coleta, protegido de luz solar.
- Caso o intervalo entre o término da coleta e o processamento da amostra no laboratório seja superior a 2 horas, refrigerar a amostra (temperatura entre 2 e 8°C), que pode ser processada em até 24 horas.

Crítérios de rejeição

- Amostras não identificadas.
- Amostras encaminhadas em formol.

Crítérios de processamento com restrição de análise

- Amostras que não obedeceram aos critérios pré-analíticos definidos.

Sangue ou sangue de medula óssea

- A investigação de micobactérias no sangue é indicada caso haja suspeita de bacteremia por MNT, especialmente *Mycobacterium avium complex*, ou por TB disseminada, principalmente em imunocomprometidos; entre eles, o principal grupo de risco são os pacientes com aids em estágios avançados. Outros grupos de risco são pacientes sob terapia imunossupressora, diabetes, alcoolismo e doenças hematológicas.

Coleta

- Deve ser realizada por meio da coleta do sangue periférico e/ou da medula óssea, que deve ser preferencialmente inoculado em frasco de hemocultura específico para micobactérias.
- Na ausência de frasco de hemocultura específico para micobactérias, coletar em tubo com anticoagulante, porém não usar tubo com EDTA, pois este inibe o crescimento de micobactérias. O anticoagulante menos tóxico para micobactérias é o *sodium polyanethol sulfonate* (SPS), e deve ser utilizado em uma proporção de 1,5 mL de SPC a 0,35% para 8,5 mL de sangue.
- Volume:
 - a. Sangue periférico: em adultos, coletar o volume máximo do frasco (5 mL).
 - b. Sangue da medula óssea: volume mínimo/ideal cerca de 0,5 a 1 mL.

- A coleta do sangue periférico, além de ser um procedimento menos invasivo, possui sensibilidade semelhante ao do sangue da medula óssea. A única vantagem da coleta de sangue de medula óssea é que, neste caso, é possível solicitar também pesquisa de BAAR, sendo necessário fazer esfregaço na lâmina antes de aspirar volume maior para a hemocultura, embora esse exame apresente uma baixíssima sensibilidade.

Transporte e conservação pré-analítica

Manter em temperatura ambiente até incubação da amostra; não refrigerar.

Crítérios de rejeição

Amostras não identificadas ou frascos de hemocultura rachados.

Crítérios de processamento com restrição de análise

Amostras que não obedeceram aos critérios pré-analíticos definidos.

Fezes

Material cuja análise é desencorajada, pois pode refletir micobactéria presente em escarro deglutido, e não TB intestinal, sendo que para esta suspeita clínica é indicada a biópsia do intestino.

INTERPRETAÇÃO PÓS-ANALÍTICA

Pesquisa de BAAR

Embora seja uma ferramenta diagnóstica rápida, acessível e de baixo custo, a sensibilidade da pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) é muito variável (22 a 78%), devendo ser encorajado o exame de cultura para micobactérias em conjunto, por ser mais sensível e também permitir o isolamento e identificação da micobactéria.

Sabe-se que para a pesquisa de BAAR no escarro ser positiva, são necessários 5 a 10 mil bacilos por mL, enquanto para a cultura ser positiva, são necessários 10 a 100 bacilos viáveis por mL.

Deve-se lembrar que a pesquisa também não é específica, permitindo diagnóstico apenas presuntivo, visto que a pesquisa positiva para micro-organismo álcool-ácido resistente pela coloração de Ziehl Neelsen não garante que seja uma micobactéria, pois há outros micro-organismos também álcool-ácido resistentes, em graus variáveis, que podem resultar positivos: *Nocardia*, *Rhodococcus*, entre outros (*Legionella micdadei*, cistos de *Cryptosporidium*, *Isospora* e *Microspo-*

ridium), embora um técnico experiente possa diferenciá-los pela morfologia. Também não permite diferenciar entre CMTB e MNT.

No geral, conforme publicado no Diário Oficial em 21 de março de 2006, orienta-se liberação do resultado final em até 24 horas da coleta, enquanto para amostras de unidades de atendimento de emergências/urgências, recomenda-se liberação em até 4 horas.

Para serviços que utilizam na pesquisa de BAAR leitura pelo método de imunofluorescência com Auramina (40x), este deve ser apenas uma triagem, e seus resultados positivos ou duvidosos devem ser recordados na mesma lâmina com Ziehl Neelsen (100x) para confirmação e análise do resultado em cruzeiros.

Para a baciloscopia BAAR realizada com o escarro espontâneo, por meio do método direto ou após concentração, corados pelo método de Ziehl Neelsen, a leitura e a interpretação dos resultados devem ser realizadas conforme padronização do Ministério da Saúde (Tabela 1).

Tabela 1 Critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia de escarro (após concentração ou não), corada pelo método de Ziehl Neelsen

| Achado microscopia (100x) | Resultado |
|--|---|
| Não encontrado BAAR em 100 campos | Negativo |
| Encontrado 1 a 9 BAAR em 100 campos | Relatar a quantidade de BAAR encontrada |
| Encontrados 10 a 99 BAAR em 100 campos | Positivo + |
| Encontrado 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados | Positivo ++ |
| Encontrados em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados | Positivo +++ |

É importante fazer referência no laudo se o método analítico da pesquisa de BAAR é “método direto” ou se é realizado por “método concentrado”, visto que isso pode interferir na quantificação de cruzeiros, já que devem ser interpretados de forma igual, independentemente do método. Pacientes em tratamento que acompanham com esse exame para analisar evolução, podem sofrer interferência na análise quando há modificação do “método direto” para um “método concentrado”, podendo simular até falha terapêutica.

Para a baciloscopia BAAR realizada com outras amostras clínicas, por meio do método direto ou após concentração, corados pelo método de Ziehl Neel-

sen, a leitura e a interpretação dos resultados devem ser realizadas conforme padronização do Ministério da Saúde (Tabela 2).

Tabela 2 Critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia a partir de outras amostras clínicas (após concentração ou não), corada pelo método de Ziehl Neelsen

| Achado microscopia (100x) | Resultado |
|--|-----------|
| Não foram encontrados BAAR no material examinado | Negativo |
| Foram encontrados BAAR no material examinado, em qualquer quantidade | Positivo |

Avaliar em sítios não estéreis a possibilidade de colonização da flora local, como pode ocorrer na uretra distal. Correlacionar com os dados clínicos e com o resultado da cultura para micobactérias.

Cultura para micobactérias

Na análise de uma cultura para micobactérias, deve-se ponderar a própria patogenicidade da espécie, especialmente em sítios não estéreis (Tabela 3).

Tabela 3 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</i> ssp <i>paratuberculosis</i> | <i>M. celatum</i> | <i>M. haemophilum</i> | <i>M. marinum</i> | <i>M. szulgai</i> |

(continua)

Tabela 3 Espécies de micobactérias classificadas conforme patogenicidade para seres humanos (continuação)

| Patogênicas | | | | |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <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 patogênicas | | | | |
| <i>M. agri</i> | <i>M. cookii</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. non chromo- genicum</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.

Quando presente uma cepa de CMTB, esta traduz TB no sítio do isolamento no qual a cepa foi isolada. Atentar que é uma doença de notificação compulsória, sendo o laboratório muito importante nesse cenário.

O diagnóstico de doença por MNT exige cautela, pois o seu isolamento a partir de espécimes clínicos não estéreis pode significar colonização transitória ou, ainda, contaminação. Um dos critérios de definição de doença nesses sítios é o isolamento da mesma espécie em ao menos duas amostras do mesmo sítio coletadas em dias diferentes.

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, que estão cada vez mais prevalentes entre a população geral. A doença que ocasionam é denominada micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia.

Algumas espécies de MNT ainda estão relacionadas a infecções em pacientes submetidos a procedimentos invasivos (cirurgias estéticas, oftalmológicas,

cardíacas e até mesmo acupuntura). As espécies de crescimento rápido comumente envolvidas são: *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae*.

O resultado de uma cultura para micobactérias negativa sugere ausência de infecção pulmonar por micobactéria ou, ainda, resposta a tratamento de TB (ou outras micobacterioses), porém deve-se atentar para possível falso-negativo em pacientes em tratamento de pneumonia com fluoroquinolona.

Outro resultado possível é a de cultura contaminada, ou seja, o meio de cultura da amostra foi contaminado com bactérias/fungos que inviabilizam o crescimento de micobactéria e deve-se considerar nova coleta, a critério médico.

Todos os resultados devem ser correlacionados com as pesquisas de BAAR correspondente da amostra, para a análise de indicadores que traduzam a qualidade da fase analítica no laboratório. Para mais informações sobre esse assunto, consultar o documento “Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica”, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), de 2013.

BIBLIOGRAFIA

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (Anvisa). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica. Brasília, 2013.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose. Brasília, 2008.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Série TELELAB. Brasília, 2001.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute M48-A. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline 2008;28(17).
5. Crump JA et al. Bacteremic disseminated tuberculosis in Sub-Saharan Africa: a prospective cohort study. Clin Infect Dis 2012;55(2):242-50.
6. Crump JA, Reller LB. Two decades of disseminated tuberculosis at a University Medical Center: The expanding role of mycobacterial blood culture. Clin Infect Dis 2003;37:1037-43.
7. Ernst JD et al. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. J Clin Invest 2007;117:1738-45.
8. Hada DJ et al. Metodologia para coleta de escarro espontâneo para confirmação microbiológica do diagnóstico de tuberculose pulmonar, doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas ou para controle de tratamento desses agravos em ambientes ambulatorial e hospitalar. J Infect Control 2014;3(1):1-30.

9. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook – Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. 2.ed. ASM, 2004.
10. Organização Mundial da Saúde. Manual de biossegurança para laboratórios da tuberculose. 2012.
11. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. 2013.

4. Antibiograma

INTRODUÇÃO

A determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA ou antibiograma) é uma das principais tarefas do laboratório de microbiologia clínica. Em muitas situações, sob o ponto de vista do clínico, os resultados do antibiograma são considerados mais importantes do que a própria identificação do micro-organismo envolvido no processo infeccioso. Em parte, isso pode ser explicado pelo aumento mundial de micro-organismos multirresistentes, o que limita a opção terapêutica. Como consequência, o laboratório deve dar prioridade não só à produção de dados precisos, mas também deve liberar laudos que sejam facilmente interpretáveis.

Os objetivos do teste são detectar possível resistência ao medicamento em patógenos comuns e assegurar a suscetibilidade a drogas de escolha para infecções específicas. Os microbiologistas podem avaliar interações *in vitro* entre um micro-organismo isolado e os agentes antimicrobianos. O antibiograma liberado pode fornecer dados para ajudar o clínico a decidir as drogas de escolha ou, ainda, as doses dos agentes antimicrobianos adequadas ao tratamento da infecção.

Os métodos de análise disponíveis incluem: diluição em caldo, diluição em ágar, difusão em ágar (disco difusão) ou sistemas comerciais automatizados. Os métodos manuais, amplamente difundidos no Brasil, proporcionam flexibilidade, e métodos que geram possíveis reduções de custos incluem a difusão em ágar e métodos de fita com gradiente (E-teste® ou M.I.C.Evaluator®). Cada método tem pontos fortes e fracos, dependendo, em parte, dos organismos testados. Alguns métodos fornecem resultados quantitativos (concentração

inibitória mínima – CIM), e todos fornecem avaliações qualitativas usando a categoria sensível, intermediário ou resistente.

METODOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA A REALIZAÇÃO DO ANTIBIOGRAMA

Alguns métodos para realização do antibiograma, convencionais ou automatizados, estão disponíveis para os laboratórios de microbiologia clínica. Esses métodos incluem microdiluição, difusão em ágar, gradiente de antimicrobiano e sistemas automatizados. No Brasil, o teste de difusão em ágar continua sendo o mais adotado, por causa da flexibilidade na seleção de drogas, capacidade de responder rapidamente às mudanças de interpretação dos pontos de corte estabelecidos pelos comitês, possibilidade de adição de novos antimicrobianos ao painel do TSA e, principalmente, em virtude do baixo custo.

No teste de difusão em ágar, os discos impregnados com concentrações preestabelecidas de antimicrobianos a serem testados, os quais se relacionam, entre outros fatores, com a concentração sérica atingível, são adicionados a placa de ágar Mueller Hinton. Após o período de incubação, o halo de inibição é medido e categorizado, de acordo com os critérios estabelecidos por documentos padronizados. Diversos documentos para padronização e interpretação do antibiograma estão disponíveis. No Brasil, os mais rotineiramente adotados são Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (<http://clsi.org/>) e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Eucast (<http://www.eucast.org/>).

A metodologia de gradiente (E-teste[®] ou M.I.C.Evaluator[®]) apresenta-se como uma alternativa adequada à rotina laboratorial. Consiste em uma fita plástica que, de um lado, está impressa uma escala da CIM, e do outro existe um gradiente exponencial do antimicrobiano. Essa metodologia não é aprovada pelo CLSI, mas é aceita pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Sociedade Americana de Microbiologia. Além disso, estudos demonstram que a determinação da CIM pelo método de gradiente apresenta boa concordância com os métodos de referências. Os meios e as etapas de preparação do inóculo e da semeadura das placas são os mesmos utilizados para a técnica de difusão em ágar. A categorização da suscetibilidade deve ser realizada de acordo com os mesmos documentos descritos no parágrafo anterior.

Os sistemas automatizados utilizam cartões de plásticos para determinar a CIM. Esses cartões apresentam o antimicrobiano liofilizado e o sistema tem a

capacidade de análise computadorizada do crescimento do micro-organismo. No Brasil, os sistemas mais utilizados para realização do TSA são Vitek®, Vitek-2®, Walk-Away® e BD Phoenix®. Cabe ressaltar que os sistemas automatizados geralmente avaliam apenas 2 a 4 diluições de cada antimicrobiano, utilizando os pontos de corte específicos para categorização da CIM.

QUANDO REALIZAR O ANTIBIOGRAMA?

O laboratório de microbiologia clínica deve realizar o antibiograma somente para micro-organismos patogênicos e que sejam contemplados pelos comitês de padronização (CLSI, Eucast, Anvisa). O TSA não deve ser executado para micro-organismos integrantes da microbiota normal humana (organismos colonizadores) e para micro-organismos cuja sensibilidade aos antimicrobianos seja previsível.

Atualmente, a rotina dos métodos para realização do antibiograma é padronizada para bactérias comuns aeróbias e facultativas, como enterobactérias, *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Enterococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* do grupo *viridans* e beta-hemolítico, *Haemophilus influenzae*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* e *Vibrio cholerae*.

Em algumas situações, como *Mycobacterium tuberculosis* e fungos invasivos, a realização de antibiograma é importante para o tratamento do doente. Entretanto, este deve ser encaminhado a laboratórios especializados, nos quais os volumes de teste são suficientes para manter a proficiência técnica. Fenótipos de resistência incomum ou resultados imprecisos também devem ser encaminhados aos laboratórios de referência para confirmação.

SELEÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS QUE COMPÕEM O ANTIBIOGRAMA

O laboratório tem a responsabilidade de testar os antimicrobianos mais adequados para o micro-organismo isolado, o local da infecção e o tipo de paciente atendido. O laboratório que atende pacientes hospitalizados e/ou imunodeprimidos precisa testar rotineiramente antimicrobianos de maior espectro quando comparados com aqueles que só atendem pacientes ambulatoriais.

A composição do painel de antibióticos a serem testados não é uma decisão exclusiva do laboratório. Embora os comitês padronizadores publiquem uma lista com os antimicrobianos a serem testados diante dos grupos de micro-organismos, é imprescindível que a adequação para cada laboratório seja um

consenso entre microbiologistas, corpo clínico, farmácia, comitê terapêutico e comissão de controle de infecção hospitalar.

CUIDADOS COM DISCOS, FITAS DE GRADIENTE E CARTÕES DE SISTEMAS AUTOMATIZADOS

Os discos devem ser utilizados até a data de validade especificada pelo fabricante e armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) ou, ainda, congelados em um refrigerador *frost-free* (-20°C) até que seja necessário. Discos contendo agente betalactâmico devem sempre ser mantidos congelados, assegurando sua potência, embora uma pequena porção possa ser armazenada sob refrigeração por até uma semana.

Os laboratórios que utilizam equipamentos de distribuição mecânica de discos devem ficar atentos, pois este deve ser mantido tampado hermeticamente e armazenado no refrigerador quando não estiver em uso.

As embalagens com fitas de gradiente devem ser conservadas a -20°C até a data de validade. As fitas de gradiente da embalagem aberta devem ser armazenadas em lugar seco ou tubo com dessecante a -20°C. As fitas armazenadas e manuseadas corretamente podem ser usadas até a data de validade. É importante que apenas um único tipo de antibiótico por tubo seja armazenado.

Os cartões (painéis) de antibiograma dos sistemas automatizados devem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) e nunca ser congelados. Antes da utilização, checar a validade e realizar inspeção visual do invólucro e do próprio cartão.

Em todos os casos descritos, os antimicrobianos (discos, fitas e cartões) devem ser retirados do *freezer* ou geladeira 1 a 2 horas antes da utilização. Isso permite o equilíbrio com a temperatura ambiente, minimizando a quantidade de condensação.

PREPARO E ARMAZENAMENTO DO MEIO ÁGAR MUELLER HINTON

O meio ágar Mueller Hinton é o mais comumente utilizado nos laboratórios clínicos, além de ser recomendado pelo CLSI e Eucast. Um rigoroso controle de qualidade é importante para o antibiograma por causa das variáveis. O microbiologista deve ficar atento para algumas características do meio, como o pH, que deve estar entre 7,2 e 7,4, e pode ser medido logo após o preparo do meio. A espessura do meio de cultura distribuído em placas de Petri deve ser de aproximadamente 4 mm, garantindo a perfeita difusão do antimicrobiano.

O meio Mueller Hinton deve permanecer sob refrigeração por tempo inferior a 2 meses, desde que protegido da desidratação (embalagem plástica). Antes da semeadura com a suspensão padronizada com o micro-organismo-teste, a placa deve ser deixada em estufa para evaporação do excesso de umidade da superfície do meio.

PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

A suspensão bacteriana deve ser preparada com colônias morfológicamente semelhantes, evitando contaminação e dúvida na interpretação dos resultados. A densidade da suspensão deve ser comparada visualmente com um padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 a 2×10^8 UFC/mL). A suspensão contendo o micro-organismo a ser testado deve ser semeada em ágar Mueller Hinton em no máximo 15 minutos, evitando a mudança no padrão de turbidez.

A preparação das suspensões bacterianas a serem introduzidas nos cartões de antibiograma dos sistemas automatizados também deve ser padronizada de acordo com as recomendações de cada fabricante.

CUIDADOS NA EXECUÇÃO DO ANTIBIOGRAMA

Em até 15 minutos após a semeadura das placas com as suspensões padronizadas de bactérias, os antimicrobianos selecionados devem ser aplicados de forma uniforme sobre a superfície, com pelo menos 24 mm (centro a centro) entre eles. Não devem ser colocados mais do que 12 discos para uma placa de 150 mm de diâmetro e não mais de 5 discos sobre uma placa de 100 mm de diâmetro para evitar sobreposição de zonas.

Muitos antimicrobianos difundem-se no meio quase que imediatamente, portanto, uma vez que um disco ou fita tenha contato com a superfície do ágar, eles não devem ser movidos.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO

Após a aplicação dos discos e/ou fitas de gradiente na placa, elas devem ser levadas à estufa em até 15 minutos. Atraso na incubação permite excesso pré-difusão dos agentes antimicrobianos. A incubação se dá a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas, tempo variável de acordo com o agente antimicrobiano testado, conforme indicado no manual dos comitês utilizados. Alguns micro-organismos testados em meios suplementados necessitam de uma atmosfera com $5 \pm 1\%$ de CO_2 .

A organização das placas de antibiograma na estufa não deve formar pilhas grandes, garantindo uma temperatura uniforme e rápida em todas as placas.

VALIDAÇÃO DO ANTIBIOGRAMA

Cepas-controle devem ser utilizadas para monitorar o desempenho dos processos. Para os agentes antimicrobianos que fazem parte da rotina, testes de controle devem ser realizados diariamente. Além disso, testes de controle de qualidade devem ser executados a cada novo lote de ágar Mueller Hinton incluído na rotina laboratorial. Para o controle, devem ser utilizadas cepas padrão de coleções como *American Type Culture Collection* (ATCC). A identificação dos micro-organismos (cepa padrão) utilizados para o controle de qualidade é disponibilizada pelos comitês internacionais (CLSI, Eucast, entre outros).

É muito importante que as cepas de referência sejam obtidas a partir de uma fonte confiável, e o armazenamento deve ser mantido de modo que a viabilidade seja assegurada.

LIBERAÇÃO DO RESULTADO

O laboratório de microbiologia clínica precisa estabelecer um sistema documentado de revisão dos resultados. Esse sistema documentado serve para detectar e corrigir erros significativos de transcrição que poderiam afetar a escolha do antimicrobiano para o tratamento de uma infecção. Uma possibilidade é a revisão e conferência dos laudos liberados por um profissional de alta qualificação, antes da liberação final do resultado. Esse método se tornou um elemento muito importante na rotina laboratorial, já que, em muitos laboratórios, os resultados são interfaceados.

A análise de resultados deve ser feita de forma criteriosa, especialmente se tratando de fenótipos raros de resistência e nos casos de resistência intrínseca a antimicrobianos observados em alguns organismos. Documentos padronizadores, como Eucast e CLSI, publicam uma tabela com o perfil de resistência intrínseca dos principais micro-organismos de interesse médico.

Os sistemas de informática podem dispor de alertas, na etapa de digitação, para resultados improváveis ou absurdos. Esse sistema de vigilância é observado na análise do antibiograma pelos *softwares* dos equipamentos automatizados. É interessante que resultados críticos sejam estabelecidos documentalmente e, assim que possível, sejam liberados para o clínico solicitante.

O laboratório deve ter política e instruções escritas para a emissão de laudos que contemplem as situações de rotina, os plantões e as urgências. Assim que

possível, o antibiograma deve ser liberado para o clínico, podendo ser uma comunicação verbal ou mesmo laudos provisórios. Essas atividades devem ser registradas, incluindo a data e o horário da notificação, o responsável pela comunicação e a pessoa notificada.

BIBLIOGRAFIA

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne. 2014;34(1):M100-S24.
2. Hegstad K et al. Performance of the EUCAST Disk Diffusion Method, the CLSI Agar Screen Method, and the Vitek 2 Automated Antimicrobial Susceptibility Testing System for Detection of Clinical Isolates of Enterococci with Low- and Medium-Level VanB-Type Vancomycin Resistance: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol* 2014;52:1582-9.
3. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009;11:1749-55.
4. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2013;20:255-66.
5. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.
6. Oplustil CB, et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
7. Patel JB, Tenover FC, Turnidge JD, Jorgensen JH. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Versalovik J. Manual clinical microbiology. Nova York: American Society for Microbiology, 2011. p.1122-43.
8. Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility test methods: general considerations. In: Versalovik J. Manual clinical microbiology. 10.ed. Nova York: American Society for Microbiology, 2011. p.1115-21.
9. Win JR et al. Koneman – Diagnóstico microbiológico, texto e atlas colorido. 6.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.

5. Controle interno da qualidade

INTRODUÇÃO

O laboratório de microbiologia clínica deve assegurar a qualidade de todos os insumos e equipamentos utilizados no processamento de amostras clínicas, visando a obter o melhor e o mais rápido resultado a ser enviado ao clínico para que tome decisões acertadas sobre o diagnóstico e tratamento de seus pacientes.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO (POP)

A base do controle de qualidade é a produção de manuais de procedimentos, como o POP. Neles são detalhados desde procedimentos de coleta, de transporte de amostras, de critérios de rejeição e dos processos desde a semeadura até o laudo final. Nos POP, devem ser ainda incluídos o preparo de meios de cultura feitos no laboratório, como manusear *kits* comerciais e reagentes ou suplementos.

Todas as planilhas de controle de qualidade devem ser preenchidas por todos os funcionários treinados e, a partir dessa etapa, um funcionário designado deve relatar os resultados anormais e as medidas de correção para o supervisor imediato. Todas essas planilhas devem ser arquivadas por 2 anos.

Todos os POP devem ser revisados anualmente, com aprovação de alterações em vários níveis de competência dentro do laboratório e, a seguir, devem se tornar disponíveis nas áreas de trabalho.

INSUMOS

O controle de qualidade interno se propõe a avaliar os insumos utilizados no laboratório diariamente, liberando-os para o uso na rotina. Os testes devem

ser feitos antes da utilização desses insumos, que compreendem: testes de oxidase, catalase, PYR, produção de betalactamase através da cefalosporina cromogênica, etc., que devem também ser examinados na entrega de um novo lote e a cada troca de lote comercial (Tabela 1).

Tabela 1 Exemplos de testes de insumos

| Teste | Fabricante | Lote | Validade | Cepa testada | Resultado esperado | Resultado obtido | Visto e data |
|----------|------------|------|----------|---------------------------------|--------------------|------------------|--------------|
| Oxidase | xxxxxx | nnn | Yy/xx/zz | <i>Escherichia coli</i> | Negativo | | |
| | | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Positivo | | |
| | | | | | | | |
| Catalase | xxxxxxx | mmm | Yy/xx/zz | <i>Staphylococcus aureus</i> | Positivo | | |
| | | | | <i>Enterococcus faecalis</i> | Negativo | | |
| PYR | xxxxxx | oooo | Yy/xx/zz | <i>Enterococcus faecalis</i> | Positivo | | |
| | | | | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Negativo | | |

MEIOS DE CULTURA

Além desses testes, o controle de qualidade deve analisar as características dos meios de cultura empregados na rotina.

Se forem fabricados no próprio laboratório, devem ser observados esterilidade, pH e *performance*, de acordo com cada lote preparado. Deve constar na placa um rótulo contendo nome do meio, lote, dia de fabricação e data de vencimento. Se os meios forem comprados, o desempenho como crescimento e/ou inibição de crescimento e produção de atividade bioquímica devem ser os principais testes a serem aplicados, além da análise visual, procurando sinais de deterioração, como turvação, mudança de cor ou desidratação.

CEPAS PADRÃO

Tanto para insumos como para meios de cultura, devem ser utilizadas cepas controle ATCC obtidas de fontes confiáveis e rastreáveis. Exemplos de um mínimo de cepas a serem adquiridas pelo laboratório são: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228;

Streptococcus pyogenes ATCC 19315; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, que também servem para controle de qualidade do antibiograma. No entanto, na avaliação de insumos e meios de cultura, podem também ser utilizadas cepas isoladas no laboratório que tenham sido extensivamente estudadas e que apresentem características bioquímicas estáveis, ou, mais notavelmente, as obtidas por meio de controle de qualidade externo, de acordo com a Tabela 2.

Todas as cepas devem ser armazenadas em *freezer* a -80°C , se possível, e usadas no máximo até a 5ª passagem.

Tabela 2 Controle de qualidade de alguns meios de cultura

| Meio de cultura | Micro-organismo | Resposta |
|-----------------|---------------------------------|--|
| Ágar sangue | <i>Streptococcus pyogenes</i> | Beta-hemólise |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Alfa-hemólise |
| Ágar chocolate | <i>Haemophilus influenzae</i> | Crescimento |
| | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Crescimento |
| Ágar MacConkey | <i>Escherichia coli</i> | Crescimento com colônias róseas |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | Crescimento com colônias transparentes |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | Sem crescimento |
| Ágar SS | <i>Salmonella</i> sp | Colônias negras |
| | <i>Escherichia coli</i> | Sem crescimento |

BACTERIOSCOPIA

Semanalmente, devem ser avaliados: desempenho dos corantes, tempo empregado na coloração pelo colaborador e os laudos emitidos por ele, utilizando-se lâminas preparadas a partir de um *pool* de micro-organismos ou pela repetição de lâminas obtidas de amostras clínicas. Em caso de divergências, os treinamentos são obrigatórios.

EQUIPAMENTOS

Os refrigeradores, *freezers*, estufas e banhos-marias devem ter controle diário de temperatura anotado em planilhas visíveis aos colaboradores. Qualquer alteração do valor do intervalo aceitável deve ser comunicada ao supervisor.

As autoclaves devem ser testadas semanalmente com cepas de *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* e posterior cultivo em caldo à temperatura de 55 a 60°C. A ausência de crescimento indica uma corrida estéril.

Medidores de pH devem ser calibrados com solução padrão a cada uso. As jarras de anaerobiose devem ser testadas a cada uso com tiras indicadoras de azul de metileno. Já as centrífugas devem ser controladas mensalmente com tacômetro.

As cabines de segurança devem ser inspecionadas e controladas pelo fabricante, semestral ou trimestralmente. As datas em que foram praticados esses controles devem ser anotadas e afixadas no equipamento, bem como as datas das próximas revisões.

Os equipamentos automatizados de identificação bacteriana e de teste de suscetibilidade devem ser testados a cada novo lote de cartões, placas ou painéis a serem utilizados, empregando-se as mesmas cepas padrão mencionadas anteriormente. Deve-se assegurar que as manutenções preventivas sejam feitas e seus respectivos registros sejam armazenados.

Os equipamentos automatizados de hemocultura em geral não necessitam de controle de qualidade porque o fabricante já os faz e envia a cada lote de frasco um certificado que deve ser armazenado. A semeadura de frascos com cepas controladas mostra-se muito onerosa para os laboratórios. É preciso assegurar que as manutenções preventivas sejam feitas e seus respectivos registros, armazenados.

DISCOS DE ANTIBIÓTICOS

Os discos de antibióticos devem ser estocados em *freezer* e somente a quantidade a ser usada semanalmente pode ser armazenada em geladeira.

Esses discos devem ser testados utilizando-se as tabelas do CLSI e as cepas padrão anteriormente mencionadas. Os testes de controle devem ser efetuados todas as vezes em que houver troca de lote, por, pelo menos, 1 semana ou quando da troca do fabricante ou de novo antibiótico a ser utilizado na rotina, por, pelo menos, 20 dias.

FUNCIÓNÁRIOS

Os funcionários devem ser treinados continuamente para serem qualificados para trabalhos cada vez mais complexos dentro do laboratório. Todos esses treinamentos e retreinamentos, quando não conformidades forem detectadas, devem ser documentados e assinados pelos funcionários e supervisores. To-

dos os funcionários devem estar qualificados para o desempenho de suas funções e para ser avaliados anualmente.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson NL. Quality systems in the clinical microbiology laboratory. Cumitech 3B. Washington: ASM Press, 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 2. 2013.
3. Norma PALC 2013 SBPC/ML.
4. Oplustil CP. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010. p.366-485.
5. Wilson ML. Assuring the quality of clinical microbiology tests results. Clin Infect Dis 2008;47:1077-82.

6. Ensaio de proficiência: análise crítica e plano de ação

INTRODUÇÃO

O ensaio de proficiência é uma das ferramentas que compõem a garantia da qualidade, ao lado de controle interno, controle de processos e outras medidas de gestão. Essas ferramentas juntas promovem a monitoração integrada dos processos e um ambiente de melhoria contínua.

Nesse contexto, o ensaio de proficiência tem como propósito principal identificar desvios sistematizados do processo e desvios que não são percebidos facilmente por outras ferramentas de controle. Na prática, age como um controle final que ajuda a monitorar múltiplas etapas do processo, podendo, algumas vezes, identificar necessidades de melhorias nas demais ferramentas de controle e de gestão. Por ser adotado comumente um modelo de comparação interlaboratorial (entre pares) para análise dos resultados, permite ainda uma comparação mercadológica especialmente útil para o laboratório avaliar sua realidade diante do que o cliente tem disponível, afinal, o propósito final é prover laudos confiáveis para apoiar o diagnóstico e o tratamento.

Enquanto a gestão da qualidade abraça processos pré-analítico, analítico e pós-analítico, o ensaio de proficiência se concentra na fase analítica: processamento inicial da amostra, realização do ensaio e interpretação de resultados. Há uma penetração menor e pontual nas demais fases, como alguma monitoração ligada ao tratamento prévio da amostra e na interpretação e emissão de resultados.

Por exemplo, na microscopia é necessário verificar a qualidade do corante, o processo de coloração e a proficiência do colaborador, enquanto em uma cultura, devem-se garantir a viabilidade dos meios de cultura e de reagentes,

a adequação do processo do exame e a qualificação do analista. Para ambas existem formas de controle específicas, como medidas de controle de insumos/fornecedores, controles de processo e comparação entre microscopistas. Se todos os processos estiverem bem alinhados, com bom padrão de qualidade e controles eficazes, espera-se bom desempenho no ensaio de proficiência na maior parte das vezes. Isto só não ocorre na falta ou ineficácia de algum controle ou quando se tratar de alguma falha não detectável pelas sistemáticas de monitoração adotadas.

No Brasil, a participação do laboratório nesse tipo de controle é regulada pela RDC 302/2005, que determina sua adoção para todos os ensaios para os quais exista a ferramenta disponível e o uso de controles alternativos descritos na literatura para os demais.

Por fim, é fundamental ter em mente que essa é uma oportunidade de monitorar o processo analítico como um todo, de evidenciar continuamente seu bom funcionamento e também a demanda por correções e melhorias. Seja por uma avaliação formal por parte de um provedor desse serviço ou baseada em controles alternativos geridos pelo próprio laboratório, não se deve perder de vista o cunho educativo da ferramenta e sua capacidade de tornar objetivo e claro o desempenho do processo para todos os envolvidos, permitindo-lhes atuar objetivamente no seu aprimoramento.

BENEFÍCIOS DO ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

O ensaio de proficiência tem o propósito de avaliar o desempenho do laboratório. Na área clínica, é comumente realizado com base em comparações interlaboratoriais, ou seja, múltiplos laboratórios recebem amostras idênticas ou similares e realizam simultaneamente suas análises. O provedor do programa compila todos os resultados e disponibiliza para os participantes relatórios que permitem identificar o nível de acerto e/ou de afastamento do resultado esperado, os resultados gerais de todos os participantes e, comumente, faz também comentários que ajudam na análise dos dados e na avaliação de possíveis causas de desvios.

Os dez principais benefícios citados na literatura para aqueles que adotam a ferramenta na rotina estão descritos na Tabela 1. Em geral, o ensaio de proficiência trata de falhas sistemáticas, comumente vinculadas a fatores externos (sob a gerência do laboratório, visto que este seleciona/valida fornecedores, métodos, etc.), como os relacionados ao princípio analítico, método e equipamento, e a fatores internos, como os inerentes à implantação e a instruções

do processo. Entre estes, podem-se citar rastreabilidade, linearidade, limite de detecção, robustez, sensibilidade, comutabilidade, contaminação e calibração.

Tabela 1 Benefícios que podem ser obtidos a partir do ensaio de proficiência

| |
|---|
| Caracterizar a tendência e a imprecisão dos ensaios em diferentes métodos |
| Correlacionar variáveis específicas do método com a tendência e a imprecisão |
| Identificar interferentes e quantificar os seus efeitos em diferentes métodos |
| Promover informação confiável sobre o desempenho das metodologias |
| Permitir a percepção de desempenho aquém do aceitável/desejável |
| Possibilitar a tomada de ações corretivas e preventivas |
| Padronizar práticas de acordo com o mercado |
| Promover a melhoria da prática laboratorial |
| Prover segurança ao paciente |
| Satisfazer requerimentos de acreditação e de órgãos reguladores |

Dentro da perspectiva da qualidade, o ensaio de proficiência é uma ferramenta importante para avaliar o processo, mas não é a única. Não pode ser adotado em substituição a controles internos e outras ferramentas de controle de processo. Sua principal vocação está vinculada a desvios sistêmicos, vícios do processo que não são ou não foram percebidos pelas demais formas de controle. Assim, não atua como substituto, e sim como mais uma oportunidade para manter o processo dentro do especificado.

Se for usado continuamente, o ensaio de proficiência pode dar alertas de manutenção da qualidade especificada e da demanda por melhorias. Na ocorrência de desempenho aquém do planejado, a análise completa dos dados disponíveis no programa e dos processos do laboratório ajuda a determinar ações para a correção do problema e identificar causas relacionadas a falhas no processo ou a falhas de controle ou gestão, o que deve resultar em ações de aprimoramento para evitar sua repetição.

Em tese, com o passar do tempo, as medidas de melhoria levariam o laboratório a um nível de qualidade tal que seria reproduzido excelente desempenho no ensaio de proficiência. Entretanto, o laboratório está sempre em constante movimento, novos ensaios, novos métodos, novas instalações, mudanças estruturais e novos profissionais. Por isso, são imprescindíveis as contínuas

adoção e atenção às ferramentas de controle, assim como o entendimento de que eventualmente processos com desempenhos fora do esperado precisam ser corrigidos e que esta é uma demanda natural do processo.

REQUISITOS DO ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

Embora exista uma variedade de modelos e formas de ensaio de proficiência, no seguimento clínico, costuma ser aberto a quem desejar participar, com frequência contínua (rodadas regulares) e análise simultânea pelos participantes de subamostras, com o propósito de verificar o desempenho do laboratório na realização da análise.

No Brasil, existem o programa da ControlLab, vinculado à Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, e o PNCQ, vinculado à Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Alguns laboratórios também adotam o Surveys do College of American Pathologists (CAP) para os ensaios não atendidos pelos programas nacionais. Existem outros programas nacionais menores direcionados para pequenos grupos de ensaios ou outros segmentos laboratoriais, assim como existem programas internacionais que atendem à microbiologia.

Toda participação em ensaio de proficiência é válida, desde que o laboratório o seleccione de forma consciente, baseado em requisitos técnicos e na sua demanda. A ISO/IEC 17043:2010 descreve dez características a serem avaliadas na seleção de um programa. São elas:

1. Cobertura: para abranger o maior escopo possível, o laboratório deve selecionar os programas conforme seu menu de exames, modelos de programa e formas de inscrição disponíveis. Existem programas modularizados e outros com inscrição por pacote. Entretanto, há também programas específicos, como os de bacteriologia ambulatorial e hospitalar da ControlLab, cujo formato difere para atender às demandas específicas do público do laboratório.
2. Frequência: esse requisito é composto pela quantidade de rodadas anuais, quantidade de materiais distintos oferecidos a cada rodada e quantidade de dosagens realizadas em cada material. A análise de um único material em rodadas mensais difere da análise de três materiais a cada trimestre, embora ambos somem 12 análises anuais. Enquanto o primeiro mantém um fluxo mais frequente na rotina, o segundo dá mais subsídios para a identificação

de desvios sistêmicos. De maneira análoga, a análise repetida de um mesmo material permite avaliar imprecisão e, em alguns casos, estimar a incerteza. A análise repetida é menos usual no segmento clínico, uma vez que são adotados controles internos com maior eficiência para esse fim.

3. Informações disponíveis: o participante deve ter a sua disposição informações do programa, instruções detalhadas sobre armazenagem, manuseio e análise dos materiais, restrições e características específicas do programa (que podem impactar no manuseio, análise e na interpretação dos resultados), instruções para registro de dados e resultados, prazos relacionados e descrição do tratamento estatístico dos resultados, critérios e métodos de avaliação de desempenho.
4. Logística de distribuição: o modelo de distribuição e a embalagem são fundamentais para garantir estabilidade e segurança durante o transporte.
5. Qualidade dos materiais: a matriz deve ser similar à analisada na rotina, buscando-se sempre um equilíbrio com o risco à segurança e à estabilidade do material. Os materiais precisam ser homogêneos (não variar entre participantes) e estáveis. As concentrações e os elementos analisados devem variar conforme a rotina. O provedor deve abranger as cepas de maior relevância na rotina, no que se refere à frequência de ocorrência, grau de dificuldade e importância clínica, por exemplo. No caso de análises quantitativas, é necessário abranger o intervalo de resultados que ocorrem na rotina e, para os positivos e negativos, devem-se variar os resultados de forma não previsível para o participante. O volume fornecido para o participante deve ser compatível com sua demanda.
6. Tratamento de dados e modelo estatístico: o tratamento de dados e modelos estatísticos adotados devem ser claramente identificados. Algumas normas internacionais descrevem métodos consolidados para esse fim, como a ISO 13528 e o Protocolo Harmonizado da IUPAC. Se nenhum modelo descrito na literatura se aplicar, o provedor deve descrevê-lo e embasá-lo.
7. Critérios de avaliação e de determinação de desempenho: a própria ISO/IEC 17043, assim como as demais normas citadas para o tratamento dos dados, apresenta modelos para a determinação de desempenho. Enquanto para ensaios quantitativos comumente se determinam critérios pautados no valor de tendência central obtido pelos participantes (média ou mediana), para ensaios qualitativos, o resultado aceito é comumente definido já no preparo de controle de qualidade do material, mediante qualificação prévia

- da matéria-prima e ensaios de controle (homogeneidade e estabilidade), e validado pelo consenso com os participantes ou laboratórios de referência.
8. Relatórios e prazos: os relatórios devem ter todas as informações necessárias à análise e interpretação de resultados para o participante, abrangendo sua avaliação individual, um resumo estatístico de todos os participantes e discussões técnicas pertinentes.
 9. Política de sigilo: exceto se definido de maneira diferente por alguma legislação do país, os dados individuais são comumente disponibilizados apenas para o próprio. Para terceiros, apenas quando autorizado pelo laboratório. Tal política é comumente declarada pelo provedor na fase de contratação.
 10. Custo: esta característica tem relação direta com o modelo do programa, dos ensaios relacionados, da qualidade do material envolvido e com a estrutura operacional dedicada pelo provedor. O custo deve ser ponderado diante do benefício que a ferramenta agrega.

Esses critérios podem ser acrescentados dos selos de qualidade e creditações. Para atender requisitos de gestão e de qualidade, existe a ISO série 9000; para a qualificação técnica do provedor, hoje há, no Brasil, a opção de se acreditar junto ao Inmetro. Tais selos ajudam na avaliação da qualificação do provedor e conferem maior segurança ao laboratório, embora não eliminem a necessidade do laboratório analisar os pontos descritos anteriormente.

APLICAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

A microbiologia tem especificidades que fazem com que ela seja uma área de custo relativamente alto, com grande demanda de insumos, múltiplos processos analíticos e qualificação técnica específica de pessoal, o que, conseqüentemente, requer múltiplas ações de controle. O ensaio de proficiência ganha destaque nesse cenário e surge o desafio de acompanhar a ampliação e modernização dessa área.

Programas para Gram, BAAR, cultura e teste de sensibilidade consolidados estão disponíveis no país. No Brasil, já há disponibilidade também para detecção de alguns antígenos para malária e para hanseníase. Já foram realizados estudos e pilotos para culturas de anaeróbios, culturas de vigilância (CVRE, MRSA, KPC, etc.), vírus respiratório, detecção viral em fezes e demais pesquisa/detecção de antígenos, que até então só seriam atendidos por programas internacionais. Testes por biologia molecular ainda demandam estudo no cenário mundial.

ANÁLISE CRÍTICA DE RESULTADOS

Participar ativamente do ensaio de proficiência e reproduzir exatamente a rotina ao analisar os itens do programa são requisitos básicos para que a avaliação dos resultados corresponda à realidade do laboratório e agregue valor no que tange à melhoria da qualidade. Entretanto, essa é apenas a primeira etapa para o laboratório. O desafio que muitas vezes se impõe é ter uma sistemática para analisar os resultados e dedicar tempo de forma contínua para esse fim.

Dentro de uma rotina intensa, os gestores devem organizar uma sistemática de análise dos relatórios do provedor para viabilizar os benefícios da participação: oportunidade de melhoria contínua. Para isso, é fundamental que todos os envolvidos no processo analítico entendam a importância e o propósito da ferramenta, conheçam bem o programa (como funciona, como os dados são tratados, quais os critérios de avaliação, etc.), realizem a primeira fase de cada rodada adequadamente (recebimento, manuseio, análise do material e reporte de dados e resultados) e, por fim, analisem o relatório com base no seu conhecimento do programa e da rotina laboratorial.

A eficácia da participação se obtém quando, na segunda fase da rodada de um ensaio de proficiência, o laboratório analisa em tempo hábil os relatórios do programa e envolve sua equipe nesse processo para a identificação de causas de desvio e desenho de um plano de ação para corrigi-lo (correção) e evitar sua repetição (ação corretiva).

Uma falha comum a ser evitada é o não envolvimento da equipe detentora do conhecimento da rotina do processo de análise e a não análise de todos os dados fornecidos pelo provedor. Os relatórios de avaliação individuais são a fonte mais adequada de dados sobre as informações declaradas pelo laboratório e do seu desempenho (comparação do seu resultado com o esperado). Relatórios estatísticos gerais demonstram o que os demais laboratórios informaram usar e obtiveram de resultado. Comentários feitos pelo provedor dão uma perspectiva analítica de terceira parte e enriquecem o conteúdo disponível sobre o ensaio, os participantes e seus resultados.

Por exemplo, quando um laboratório olha apenas para um relatório individual sobre a cultura, pode partir do princípio de que sua falha teve origem no método, pelo fato de sua automação resultar em determinada probabilidade de ser o micro-organismo que ele reportou ou, ainda, por ser problema de contaminação da amostra do provedor. Se o relatório estatístico geral for analisado, a verificação de que a grande maioria dos laboratórios conseguiu chegar no resultado esperado torna questionável a suspeita diante do método (demandando uma

análise mais criteriosa sobre as diferenças entre métodos). Nesse relatório, o laboratório pode também perceber que não há evidência de contaminação se um percentual muito pequeno de participantes reportar o possível contaminante. A Figura 1 reproduz parcialmente um relatório de ensaio de proficiência, na qual uma quantidade considerável de participantes reportou uma bactéria diferente da esperada. O comentário do provedor discorre sobre essa falha, dando dicas do que pode ser verificado para identificar a causa.

| Perfil de resultados | | |
|---|-------|---|
| N | % | Micro-organismo |
| 232 | 42,6% | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| 142 | 26,1% | <i>Listeria</i> spp |
| 23 | 4,2% | <i>Enterococcus</i> spp |
| 19 | 3,5% | <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B) |
| 18 | 3,3% | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 14 | 2,6% | <i>Streptococcus</i> beta-hemolítico |
| 10 | 1,8% | Estafilococos coagulase negativa |
| 86 | 15,8% | Outros |
| Resultado(s) aceito(s) <i>Listeria</i> spp ou <i>Listeria monocytogenes</i> | | |
| Resultados adequados 68,8% | | |
| Total de participantes 544 | | |

O item continha *Listeria monocytogenes*, de acordo com os resultados do controle de qualidade do material (CQM), e consenso de 68,8%. Contudo, observou-se que vários laboratórios reportaram, para este item, os gêneros estreptococos e enterococos. O gênero *Listeria* consiste em bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos em forma de bastonetes, cocobacilo e, às vezes, cocoides. Quando cultivada em ágar sangue, são beta-hemolíticos ou alfa, e frequentemente são confundidas com os gêneros estreptococos e enterococos. Entre as provas bioquímicas mínimas disponíveis para sua diferenciação, estão a catalase, que é positiva, motilidade a 25°C positiva, formando um guarda-chuva, e o teste de CAMP positivo.

FIGURA 1 Relatório “Perfil de Resultados” do Programa da ControlLab de Bacteriologia Ambulatorial, BA NOV/2012, item BA03.

Deve-se ficar atento às diferentes características dos programas no momento da análise. A Tabela 2 apresenta o resultado de um programa no qual é enviada uma única bactéria por material, que deve ser identificada e reportada independentemente do seu potencial patológico. Nesse caso, avalia-se principalmente a capacidade do participante identificar corretamente a bactéria e é possível comparar a capacidade de obter um resultado parcial (A) ou completo (B).

Tabela 2 Resultados estatísticos do ensaio de proficiência da Controllab/SBPC para bacteriologia ambulatorial

| Rodada/ano | Item de ensaio | Micro-organismo | N. | Nível de acerto | |
|------------|----------------|--|-----|-----------------|-------|
| | | | | A | B |
| Fev/13 | 1 | <i>Pseudomonas</i> spp (A) ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B) | 533 | 12% | 88,5% |
| | 2 | <i>Streptococcus</i> beta-hemolítico (A) ou <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A) (B) | 532 | 11,6% | 80,6% |
| | 3 | <i>Enterococcus</i> spp (A) ou <i>Enterococcus faecalis</i> (B) | 531 | 35,4% | 52,5% |

A Tabela 3 apresenta resultados de um programa no qual pode haver múltiplas bactérias em um material e o laboratório deve reportar apenas as que tiverem potencial patológico. Nesse caso, avalia-se também a capacidade do laboratório de identificar múltiplas bactérias presentes no material e a existência de contaminação (especificamente em amostras negativas). Pelos dados é possível verificar maior dificuldade dos laboratórios em identificar uma segunda bactéria.

Tabela 3 Resultados estatísticos do ensaio de proficiência da ControlLab/SBPC para bacteriologia hospitalar

| Rodada (item) e caso clínico | Potenciais patógenos | N. | Nível de acerto | | |
|---|---|-----|-----------------|-------|-------|
| | | | A | B | A e B |
| Jan 2013 (1) A.M., 56 anos, portadora de aneurisma abdominal, está internada no Setor de Cirurgia Vascular para a retirada do aneurisma. Após a cirurgia de correção, fragmentos da aorta abdominal foram enviados ao laboratório para cultura | <i>Escherichia coli</i> (A) <i>Salmonella</i> spp ou <i>Salmonella</i> não <i>Salmonella typhi</i> (B) | 209 | 87,5% | 88,4% | 80,8% |
| Jan 2013 (2) R.W., 37 anos, submetida a cirurgia do rim esquerdo. A paciente encontra-se sondada e, no pós-operatório, está evoluindo com infecção urinária. Foi colhida urina e enviada ao laboratório de bacteriologia para cultura. Micro-organismo(s) isolado(s) em ágar CLED | <i>Serratia marcescens</i> (A) <i>Citrobacter freundii</i> (B) | 208 | 78% | 75% | 66,3% |
| Jan 2013 (3) P.L., 3 anos, internado na pediatria para tratamento de pneumonia. No oitavo dia de antibioticoterapia, apresentou diarreia. A clínica solicitou coprocultura | Ausência potencial de patógeno (A) | 205 | 61,4% | - | - |

É fundamental o entendimento de que o ensaio de proficiência provê dados ricos sobre o desempenho do laboratório, mas que estes só têm valor se interpretados por profissionais do laboratório. A equipe tem conhecimento técnico sobre a sua rotina, portanto, capacidade real de reflexão quanto aos processos para identificação das causas e definição de ações decorrentes.

LISTA DE POSSÍVEIS CAUSAS DE FALHAS

As possíveis falhas podem ser inicialmente divididas em dois grupos: falhas de participação no programa e falhas operacionais do laboratório. As falhas de participação devem ser evitadas, mas, quando ocorrem, chamam a atenção para a capacitação da equipe diante do programa. O ideal é que não existam falhas de participação no programa, para evitar qualquer ruído na existência de falhas operacionais, permitindo que estas sejam claramente percebidas, concretizando o propósito do programa.

Entre as falhas de participação, podem-se citar:

- Armazenagem e manuseio impróprio do material.
- Falha na reconstituição ou diluição do material, ou uso de fator matemático errado.
- Uso de pipetadores com calibração imprópria para reconstituição ou diluição.
- Reporte em unidade ou formato diferente do solicitado pelo provedor.
- Dados (p.ex., sistema analítico) informados errados ou incompletos.
- Falha na transcrição dos resultados: digitação, troca de resultado, etc.
- Propagação de erro por troca de informação com outro participante.

Entre as falhas de processo a serem avaliadas para a microbiologia, devem-se incluir:

- Inadequação do corante: precipitação, contaminação ou *performance*.
- Ineficiência da sistemática de controle do corante: periodicidade ou ausência.
- Ineficiência da sistemática de controle do meio: ausência de controle de esterilidade ou de *performance* a cada lote diante da capacidade de crescimento do micro-organismo relevante e/ou de inibição – meios seletivos.
- Ineficiência da sistemática de controle de reagentes e soluções: ausência ou ineficiência do controle de esterilidade, da positividade/negatividade a micro-organismos específicos, da resposta da absorvância da turvação, etc.
- Ineficiência da sistemática de controle de testes bioquímicos: ausência ou ineficiência do controle de esterilidade e *performance*.
- Falha na preservação e no controle de micro-organismos em armazenagem, procedimento de reativação, manuseio, testes de viabilidade, identificação, características primárias e pureza.

- Procedimento ineficiente de limpeza das lâminas (sujeira e gordura).
- Má qualidade do esfregaço a respeito de espessura, forma e comprimento.
- Fixação pelo calor: subaquecimento com perda do esfregaço ou superaquecimento provocando destruição das células.
- Descoloração excessiva: pode gerar falso Gram-negativo.
- Espessura do meio fora do padrão: pode gerar falsa sensibilidade.
- Alça microbiológica fora da especificação de volume.
- Manutenção preventiva ineficiente, incompleta ou inexistente do microscópio.
- Treinamento aquém do microscopista em alguma etapa do processo ou na leitura.

A Tabela 4 descreve três situações que ilustram possíveis causas de falhas.

Tabela 4 Exemplificação de possíveis causas de falhas

| Situação | Descrição |
|----------|--|
| 1 | Não identificação do <i>Iodamoeba butschlii</i> em amostra de fezes tem como causas o uso de solução de lugol por tempo maior que o preconizado (perda de potência) e a não padronização da capacitação dos analistas |
| 2 | Falsa sensibilidade por conta de espessura do ágar Mueller Hinton menor que a preconizada, causada por má padronização do preparo e do controle (se o laboratório preparar o meio) ou falha no controle de qualidade de insumos (se o laboratório adquirir o meio) |
| 3 | Ausência de crescimento de um micro-organismo em ágar MacConkey por falta de teste de <i>performance</i> com as cepas controle preconizadas (<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453 e <i>Escherichia coli</i> ATCC25922), que teria detectado sua inviabilidade nutritiva |

PLANO DE AÇÃO

Participar de um ensaio de proficiência inclui compromisso com uma sistemática de controle que começa com a realização das análises, passa pela análise de resultados e pela elaboração de planos de ação para tratamento de possíveis causas de falha, para detecção e tratamento de possíveis propagações de erro (como a liberação de resultados impactados para pacientes), e termina com sua execução e verificação da eficácia das ações.

Laboratórios que possuem sistemas de gestão da qualidade implantados realizam isso automaticamente a partir das sistemáticas de controle de trabalhos não conformes. Em alguns casos, fazem-no de maneira similar, repetindo toda a dinâmica já adotada, apenas com formas de registro próprias e incluindo alguns requisitos específicos.

A norma GP27 do CLSI recomenda a classificação das falhas em:

1. Erro de transcrição.
2. Problemas metodológicos.
3. Problemas técnicos.
4. Problemas nos equipamentos.
5. Problemas com o material do programa.
6. Problemas com a avaliação do resultado.
7. Problemas não esclarecidos.

Algumas das classes propostas pelo CLSI (1, 5 e 6) têm relação direta com o programa, sendo a primeira uma falha do participante ao reportar resultados e as duas outras do provedor. Embora o uso contínuo do programa reduza a possibilidade de erro de transcrição e a boa qualificação do provedor diminua problemas com o material e as falhas de avaliação, é fundamental que o participante verifique tais possibilidades e estabeleça uma comunicação ativa com o provedor para certificar-se da ausência dessas ocorrências. Essas situações acabam por agregar conhecimento relativo ao programa e aos dados e relatórios disponibilizados, sendo muito rico para o laboratório.

É interessante que o plano de ação contenha:

- Análise conjunta de todos os resultados reportados para o ensaio que apresentou falha: no caso de um programa com múltiplos materiais na rodada, mesmo para ensaios qualitativos, os dados devem ser analisados de forma comparativa para avaliar tendência.
- Análise de resultados passados: a análise conjunta de resultados passados ajuda a verificar recorrência ou possíveis indícios do início da falha a partir de comportamentos tendenciosos. No caso de recorrência, aponta para a possibilidade de não se ter agido sob a causa raiz ou de as ações corretivas não terem sido efetivas.

- Definição da causa raiz: a análise da causa deve ser profunda para garantir a eficácia das ações a serem definidas. A lista de possíveis causas apresentada neste capítulo pode ajudar nesse sentido.
- Análise de impacto em resultados da rotina e ações decorrentes: é importante que o laboratório avalie a propagação do erro em resultados de paciente e avalie essas situações quanto às suas possíveis consequências para o diagnóstico e tratamento. Tal análise o ajuda a definir o que deve ser feito e a melhor forma de minimizar o impacto.
- Definição de ações corretivas: as ações devem agir na causa raiz para eliminá-la e evitar que ela volte a ocorrer. A definição das ações deve incluir prazos e responsáveis. Os prazos devem levar em conta a gravidade da falha e o risco de propagação.
- Controle e verificação de eficácia das ações: é importante haver controle da implantação das ações, do respeito aos prazos estimados e da verificação da eficácia das ações. No caso de não cumprimento do planejado ou de identificação de ineficácia, é fundamental determinar o possível impacto e traçar um novo plano de ação. Em algumas situações, a verificação da eficácia pode ocorrer pela análise de novo material do ensaio de proficiência (provedores costumam ter disponíveis para aquisição) ou aguardar uma nova rodada do programa.

CONTROLES ALTERNATIVOS

Controles alternativos são necessários para análises não contempladas por ensaio de proficiência. A complexidade da sua organização e a dificuldade de definir resultados esperados (ou de referência) ajudam na compreensão de por que eles não devem ser vistos como substitutos do ensaio de proficiência. Entre as práticas descritas na literatura e mais aplicáveis, estão:

- Comparação interlaboratorial: similar ao ensaio de proficiência, na qual o laboratório troca amostras com laboratórios que adotam metodologias similares. Nesse caso, é necessário definir o resultado de referência com cautela (p.ex., algum laboratório com maior experiência) e proceder discussões produtivas entre os participantes em caso de discordância de resultados.
- Simples cego: introdução na rotina de material com resultado esperado já determinado, como cepa controle, materiais de pacientes já analisados, para comparação dos resultados diante do previamente definido.
- Duplo cego: introdução simultânea na rotina de duas ou mais amostras de uma mesma origem para comparação de compatibilidade de resultados.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. Brasília: Anvisa, 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 1: biossegurança e manutenção de equipamentos de laboratório de microbiologia clínica. Brasília: Anvisa, 2013.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Seleção, uso e interpretação de programas de ensaio de proficiência por laboratórios. Brasília: Anvisa, 2006. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e09ce40047457ee18aaade3fbc4c6735/selecao_uso_laboratorio.pdf?MOD=AJPERES. Acessado em: 30 abr 2014.
4. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute – Using Proficiency Testing to improve the clinical laboratory. Approved guideline – Second Edition. GP27A2. 2010;27(8).
5. Chaves JSC, Marin VA. Avaliação do controle externo da qualidade nos laboratórios clínicos do Rio de Janeiro de 2006 a 2008. J Bras Patol Med Lab 2010;46(5):391-4.
6. Controle de qualidade: fundamentos, aplicação e prática. Carla Albuquerque. ControlLab 2007.1. Disponível em: http://www.controllab.com.br/pdf/guia_cq_2007_alta_res.pdf. Acessado em: 30 abr 2014.
7. Cooper G et al. Collective opinion paper on findings of the 2010 convocation of experts on laboratory quality. Clin Chem Lab Med 2011;49(5):793-802.
8. Gonçalves EMN, Castilho VLP. Controle de processo em parasitologia. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório. v.1. Rio de Janeiro: ControlLab, 2011. p.95-117. 2012. Disponível em: http://www.controllab.com.br/pdf/GestaoDaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL3_PDF.pdf. Acessado em: 28 abr 2014.
9. ISO/IEC 17043:2010 – Conformity assessment - General requirements for proficiency testing.
10. Libber JC et al. Characterization and classification of external quality assessment schemes (EQA) according to objectives such as evaluation of method and participant bias and standard deviation. J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:665-78.
11. Munhoz MAG, Medeiros N. Comparação intralaboratorial em microscopia. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório. v.1. Rio de Janeiro: ControlLab, 2011. p.95-117. Disponível em: http://www.controllab.com.br/pdf/GestaoDaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL1_PDF.pdf. Acessado em: 28 abr 2014.
12. Oplustil CP et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. São Paulo: Sarvier, 2010.
13. Sá A et al. Ensaio de proficiência. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório. v.2. Rio de Janeiro: ControlLab, 2011. p.47-95. 2011. Disponível em: http://www.controllab.com.br/pdf/GestaoDaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL2_PDF.pdf. Acessado em: 28 abr 2014.

14. Thomas A. External quality assessment in laboratory medicine: is there a rationale to determine frequency of surveys? *Accredited Qual Assur* 2009;14:439-44.
15. Thompson M et al. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories – IUPAC Technical Report. *Pure Appl Chem* 2006;78(1)145-96.

7. Biologia molecular no laboratório de microbiologia

INTRODUÇÃO

Os cinco exames de biologia molecular de maior volume nos laboratórios clínicos são aqueles que detectam agentes de doenças infecciosas: HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV, HCV e HBV. Em função da tendência de centralização de métodos na maioria dos laboratórios, esses testes usualmente são alocados em um setor exclusivo de testes moleculares, e não no setor de microbiologia. Há, no entanto, testes que necessitam de uma interação mais estreita entre os setores de microbiologia e biologia molecular: identificação microbiana por sequenciamento de DNA e detecção de genes de resistência aos antimicrobianos.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR SEQUENCIAMENTO DE DNA

Não há um gene único que possa ser utilizado para a diferenciação de todas as espécies bacterianas conhecidas. No entanto, o alvo mais utilizado é o gene *rrs*, também designado como rRNA16S. Por ser um alvo presente em todas as bactérias conhecidas, é o mais utilizado na rotina de microbiologia.

Há duas abordagens possíveis. A primeira, mais comumente utilizada, é a identificação de espécies bacterianas cuja caracterização por métodos fenotípicos não tenha sido possível, enquanto a outra consiste em detectar e caracterizar patógenos em sítios estéreis.

Para a identificação de espécies a partir de culturas, o ideal é que sejam empregadas culturas puras e recentes. Apesar de haver disponibilidade de programas para a análise de sequências obtidas a partir de culturas mistas, isso dificulta a análise e, por vezes, permite apenas identificação no nível de espécie.

Outro aspecto é o fato de que para a análise dos resultados há necessidade de utilização de programa específico, disponível comercialmente, como o RipSeq. Para amostras contendo duas espécies, na maioria da vezes, é possível a identificação das espécies, mas nas amostras com três ou mais espécies bacterianas, a identificação limita-se ao gênero na maior parte dos casos.

A abordagem de menor custo e que não necessita de *software* exclusivo é o uso de culturas puras. O primeiro passo, na fase pré-analítica, é, portanto, extrair DNA de cultura pura e jovem. Culturas com maior tempo de incubação podem resultar em baixa quantidade de DNA extraído. Um bom exemplo são as espécies do gênero *Bacillus*, que são esporuladas. Quanto mais velha a cultura, proporcionalmente maior é a quantidade de esporos e mais difícil a obtenção de DNA.

Para a maioria dos gêneros bacterianos, basta a extração por lise térmica, mediante preparo de suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao padrão 1 da escala de McFarland em água livre de DNase e RNase e fervura por 10 minutos.

Para a amplificação do gene *rrs*, que tem cerca de 1.500 pares de bases, podem ser utilizados diferentes pares de iniciadores que anelam em regiões conservadas desse gene, e que flanqueiam regiões ditas hipervariáveis.

Uma vez obtidos os eletroferogramas, é necessário avaliar se há picos duplos e se estão presentes em toda a sequência ou em apenas uma a três bases. Como na maioria das espécies bacterianas há múltiplas cópias desse gene no mesmo cromossomo, é possível a ocorrência de variações de sequências na mesma cepa bacteriana. No caso de eletroferogramas com múltiplos picos duplos (Figura 1), a pureza da cultura deve ser reavaliada e todo o processo precisa ser reiniciado.

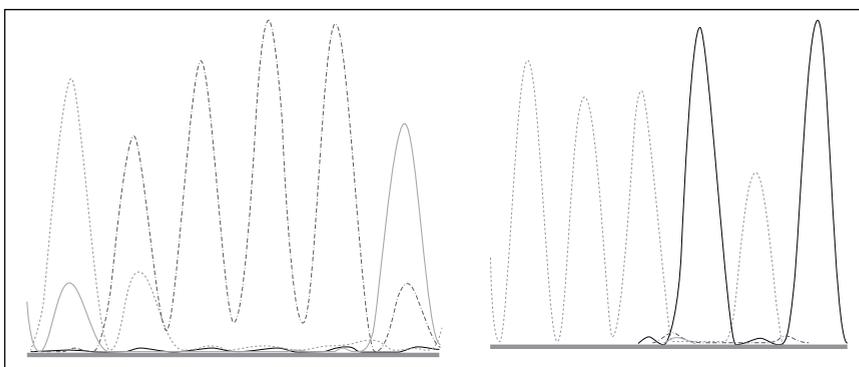


FIGURA 1 Eletroferogramas obtidos a partir de cultura mista (esquerda) ou cultura pura (direita).

O programa comercialmente disponível MicroSeq contém uma base de dados depurada, realiza a montagem da sequência consenso e libera um laudo final. É uma solução segura e de ótima qualidade para identificação bacteriana, mas, quando se lida com espécies raras, a análise pode ser inconclusiva.

Caso não seja utilizado o programa MicroSeq, diversos programas podem ser usados para obtenção da sequência consenso a partir dos eletroferogramas, a exemplo de CLCBio, DNABaser e DNASTar. Essa sequência consenso deve ser comparada com aquelas disponíveis no GenBank, utilizando-se o programa BLAST. Na opção database, selecionar a opção “Other”. Na opção “Exclude”, selecionar “Uncultured/environmental sample sequences”, pois, do contrário, a análise será mais trabalhosa e os resultados incluirão sequências de metagenoma. O próximo passo é verificar quais gêneros e espécies têm maior similaridade com a sequência que está sendo analisada. Para alguns laboratórios, a análise termina liberando-se o resultado referente ao depósito de maior similaridade com a sequência analisada; entretanto, recomendam-se alguns passos adicionais importantes. Após verificar qual é o gênero bacteriano, deve-se consultar o documento MM18 do CLSI, que detalha em quais gêneros o gene *rrs* (rRNA16S) pode ser utilizado para a diferenciação entre espécies. Um exemplo é a impossibilidade de diferenciação entre *Bacillus subtilis* e *Bacillus anthracis*, avaliando fragmentos de 500 ou 1.000 pares de bases do *rrs*. Esse documento também indica quais genes devem ser parcialmente sequenciados para a diferenciação entre as espécies.

Uma vez que seja possível a diferenciação entre as espécies utilizando-se o gene *rrs*, o próximo passo deve ser consultar, na base de dados LPSN (<http://www.bacterio.net>), qual a cepa padrão da espécie com maior similaridade obtida com o BLAST. Esse site contém as designações da cepa padrão de cada espécie nas diferentes coleções de culturas e também o código de acesso do depósito referente ao gene *rrs* da cepa padrão no GenBank. O índice de similaridade a ser reportado no resultado deve ser sempre em relação à cepa padrão da espécie. Essa abordagem evita variabilidade entre resultados liberados. A definição da espécie bacteriana é objeto de constante debate. O critério mais seguro para a identificação da espécie é um índice mínimo de 99,5% de similaridade entre a sequência analisada e aquela da cepa padrão da espécie, desde que seja analisado um fragmento com um mínimo de 1.000 nucleotídeos. Índices de similaridade entre 95 e 99,4% devem ser liberados apenas como identificação conclusiva do gênero bacteriano. Índices de similaridade inferiores a 95% usualmente indicam novo gênero bacteriano. Esse achado

deve ser confirmado com o sequenciamento de outros genes e avaliação de características fenotípicas da cepa analisada.

A despeito dos procedimentos de controle de qualidade e de processos no setor de biologia molecular, é recomendável que a liberação final do resultado seja feita pelo setor de microbiologia. Nessa fase pós-analítica, deve ser feita a avaliação da consistência entre o resultado do sequenciamento e as características fenotípicas da cepa analisada. Características mínimas, como morfologia ao método de Gram, oxidase e catalase são de execução simples e acrescentam confiabilidade ao resultado. Finalmente, o resultado deve estar de acordo com a nomenclatura oficial dos procariotos. Apenas os nomes científicos vigentes devem ser utilizados; portanto, antes de liberar a identificação, deve ser feita consulta à página do List of Prokaryotic Names with Standing in the Nomenclature (LPSN – <http://www.bacterio.net>). Opcionalmente, visando a facilitar a compreensão do laudo pelo clínico ou a compreensão da epidemiologia, a nomenclatura antiga pode ser colocada entre parênteses ao lado do nome atual. Um exemplo marcante é *Mycobacterium massiliense*, espécie que causou surtos de infecções de sítio cirúrgico em diversos estados do Brasil e atualmente é denominada *Mycobacterium abscessus* ssp *bolletii*.

DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A detecção de genes que codificam resistência a antimicrobianos pode ser realizada diretamente de amostras clínicas, como *swab* nasal, *swab* retal, sangue ou hemoculturas positivas ou ainda diretamente de culturas puras. Nos sistemas comercialmente disponíveis, a exemplo da detecção do gene *mecA*, as reações já incluem um controle interno. Alguns laboratórios têm desenvolvido testes *in house* ou simplesmente têm reproduzido métodos descritos em publicações científicas, a exemplo da reação em cadeia da polimerase (PCR) para genes que codificam carbapenemases, visando à detecção de genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. Além de elevada especificidade e da sensibilidade, toda reação que visa à detecção de um alvo gênico deve possuir controle interno. Se o alvo é DNA bacteriano, o controle interno que pode ser utilizado tanto em amostras clínicas como para a análise de cepas bacterianas é o rDNA 16S. Idealmente, o produto amplificado do controle interno deve ter tamanho maior do que aqueles dos alvos do teste, de modo a não haver competição. O uso do controle interno garante que não houve inibição da DNA polimerase na PCR.

Outro aspecto importante se refere a como liberar o laudo. É essencial que, nos testes para detecção de genes que codificam betalactamases, conste no lau-

do quais variantes são detectadas com os iniciadores e sondas utilizados, pois nas betalactamases há uma constante descrição de novas variantes.

Da mesma maneira que na identificação de espécies, é recomendável que o resultado da detecção de genes de resistência em cepas bacterianas deva ser liberado pelo setor de microbiologia, de modo a confrontar os resultados. A positividade do teste fenotípico e a negatividade do teste molecular pode indicar tratar-se de um novo gene ainda não descrito ou uma nova variante alélica também ainda não descrita, com variação da sequência nucleotídica na região de anelamento dos iniciadores.

BIBLIOGRAFIA

1. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):840-62.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Interpretative Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline*. CLSI document MM18-A (ISBN 1-56238-664-6). Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
3. Wolff TY, Eickhardt S, Björnsdóttir MK, Moser C, Bjarnsholt T, Hoiby N et al. Direct sequencing and RipSeq interpretation as a tool for identification of polymicrobial infections. *J Clin Microbiol* 2013;51(4):1281-4.

8. Espectrometria de massa MALDI-TOF em laboratório de microbiologia clínica: parâmetros e conceitos pré e pós-analíticos úteis para a rotina

INTRODUÇÃO

A espectrometria de massa (SM) começou a ser aplicada na identificação de micro-organismos nos anos 1970. No entanto, o grande impulso para o desenvolvimento da tecnologia foi dado em 1987 por Tanaka et al., que conseguiram ionizar grandes moléculas ao utilizar uma matriz composta por partículas de cobalto e glicerol. A demonstração da ionização de proteínas por meio da combinação de feixes de *laser* de determinado comprimento de onda e de uma matriz conferiu o Prêmio Nobel de Química para Tanaka em 2002 (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/)¹.

A SM por ionização/dessorção a *laser* auxiliada por matriz-tempo de voo (*matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*), ou MALDI-TOF, pode ser descrita da seguinte maneira: a primeira etapa consiste em depositar o analito em placa metálica e, posteriormente, acrescentar matriz de ácido α -ciano-hidroxicinâmico (ACHC), ocorrendo evaporação dos solventes e cristalização. A placa metálica, por sua vez, é introduzida no espectrômetro de massa, e feixes de *laser* UV de determinado comprimento de onda são emitidos sobre cada depósito. A matriz absorve a energia do *laser* e ocorre dessorção do analito com formação de íons com massas diferentes. Os íons formados com carga +1 movimentam-se sob a influência do campo elétrico, atravessam grades de extração e atingem o tubo de voo, na extremidade do qual se encontra o detector. Os menores íons chegam primeiro ao detector. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. A soma de íons analisados forma o espectro de massa (EM) da amostra analisada. O eixo das abscissas corresponde à relação massa/carga;

no eixo das ordenadas, encontra-se a intensidade do sinal que é relacionada à quantidade de íons de mesma massa/carga². A intensidade das massas é relacionada à quantidade de íons de mesma massa².

A principal vantagem da tecnologia de SM MALDI-TOF sobre outras técnicas laboratoriais para identificação de micro-organismos é a agilidade para obtenção do resultado. Entre a confecção do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de 30 minutos. Outro atrativo é o baixo valor de insumos em comparação aos sistemas automatizados de identificação fenotípica^{1,2}.

Dois instrumentos MALDI-TOF estão disponíveis no mercado para uso em laboratórios clínicos: MicroflexLT® (Bruker Daltonics/BD) e VITEK MS® (BioMérieux). Os EM são comparados a banco de dados ou *databases* que contém espectros de referência (ER) (biotyper, Bruker Daltonics/BD) ou “superespectros” (Myla/SARAMIS, BioMérieux) para identificação das espécies. No momento, apenas a plataforma VITEK MS® equipada com o *software* Myla® possui autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para utilização em laboratórios clínicos no país.

O *software* Biotyper® (Bruker Daltonics/BD) expressa os resultados de identificação em valores de *logscore* (LS) entre 0 e 3. Valores de LS inferiores a 1,7 são considerados insuficientes, entre 1,7 e 2,0 são classificados como suficientes para identificação de gênero e, se superior a 2,0, a identificação de espécie é assegurada. Os resultados produzidos pelo VITEKMS® (bioMérieux) são divididos em categorias como “good ID”, quando o EM obtido encontrou boa correlação com “superespectro” da base de dados (60 a 99,9% de compatibilidade, apenas um patógeno), discriminação baixa ou “low discrimination” (> 60 a 99,9% de probabilidade, dois patógenos) ou “no ID” (< 60% de probabilidade, valor de confiança)³.

Os EM obtidos pela tecnologia são constituídos de picos originados a partir de proteínas ribossomais de 2.000 a 20.000 D. Alguns desses picos são conservados, ou seja, são sempre presentes, independentemente das condições pré-analíticas, e formam as “impressões digitais” de cada espécie. No entanto, a adoção de condições pré-analíticas ideais, como tempo e temperatura de incubação e meio de cultura, é necessária para obtenção de EM de melhor *fitness* aos ER, com impacto positivo nos resultados de identificação. Para algumas espécies, os *databases* (Biotyper Bruker®, Myla®) possuem ER em pouca quantidade ou de baixa qualidade/especificidade, o que torna necessário o uso de parâmetros pós-analíticos úteis para adoção ou exclusão do resultado pro-

duzido^{4,5}. Independentemente do aparelho utilizado, é necessário que o usuário analise o *database* ou a biblioteca de ER e conheça as limitações, ou seja, espécies que não são contempladas ou contêm poucos ER. Recentemente, foi avaliado o desempenho do VITEK MS[®] para identificação das espécies *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* e nenhum dos isolados previamente identificados como *C. metapsilosis* por sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal foi identificado. No *database* Myla[®] não há ER para *C. metapsilosis* e no SARAMIS[®], apesar de haver menção de tal espécie em seu portfólio, há apenas dois EM e nenhum ER de *C. metapsilosis*. Existem diversos exemplos como esse na literatura, e ao microbiologista fica a mensagem que ainda não é possível abandonar as técnicas fenotípicas e moleculares convencionais mesmo após a aquisição de tal tecnologia. Para a obtenção de bom desempenho para identificação de espécies raras, fungos filamentosos e actinomicetos, é necessária a melhoria das bases de dados de ER.

A grande maioria dos artigos publicados é referente à plataforma Microflex LT[®] equipada com a base de dados Biotyper[®], pois tal tecnologia é amplamente difundida no continente europeu e nos Estados Unidos⁴.

PARÂMETROS PRÉ-ANALÍTICOS

Cocos Gram-positivos

As bactérias Gram-positivas possuem parede celular com grande quantidade de peptidoglicano, o que torna tais micro-organismos mais resistentes à lise em comparação às bactérias Gram-negativas. Assim, a análise de células intactas (*whole cell*), ou seja, análise direta do esfregaço das colônias, pode não ser suficiente para a identificação de alguns isolados, e extração prévia com ácido fórmico pode ser necessária para obtenção de espectro passível de identificação⁶. Quanto à temperatura de incubação e meio utilizado, ágar chocolate (COX) ou sangue (AS), não parecem influenciar nos resultados obtidos⁶. No entanto, o número de subcultivos parece impactar de forma negativa na identificação de cocos Gram-positivos (CGP)⁶.

Bacilos Gram-negativos

Um estudo comparou o percentual de identificações corretas para bacilos Gram-negativos fermentadores (BGNF) e não fermentadores (BGNNF) por meio da aplicação de esfregaços com pouco inóculo (*light*), inóculo pesado (*heavy*) e, finalmente, com ou sem aplicação de ácido fórmico para extração de proteínas. Os esfregaços com inóculos pesados e que foram submetidos

à extração com ácido fórmico produziram percentual maior de identificação para enterobactérias, e para não fermentadores, os esfregaços com inóculos pesados tiveram melhor desempenho, sem melhores resultados após aplicação de ácido fórmico⁷. Para *Pseudomonas* spp, o meio MacConkey (MAC) pode induzir a formação do fenótipo mucoide e ter impacto negativo para identificação por EM MALDI-TOF⁴. Quanto ao tempo de incubação, os EM oriundos de colônias crescidas em ágar sangue entre 24, 48, 72, 96 e 120 horas não apresentaram diferença em seus resultados de identificação⁷.

Bacilos Gram-positivos

Assim como para os cocos Gram-positivos, a extração com ácido fórmico é necessária para obtenção de melhores resultados para identificação de bacilos Gram-positivos, como *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Dermatobacter* e *Rhottia*. A extração com ácido fórmico diretamente sobre o analito na placa é suficiente, não sendo necessária a extração em tubo com álcool e ácido fórmico⁸. No entanto, para espécies do gênero *Nocardia*, são necessários outros procedimentos para extração das proteínas, como aquecimento prévio a 95°C antes da extração com etanol e ácido fórmico em tubo⁹.

Anaeróbios

Os desempenhos de identificação de anaeróbios Gram-positivos e negativos (238 isolados), incluindo *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Veillonella* spp, *Propionibacterium acnes* e *Fusobacterium* spp, por meio de análise de células intactas ou por extração com ácido fórmico foram comparados, e não houve diferença significativa entre os resultados produzidos pelos dois protocolos¹⁰.

Micobactérias

O preparo das amostras de *Mycobacterium* para identificação por EM MALDI-TOF inclui etapa importante de inativação por causa das questões de biossegurança envolvidas. Inicialmente em cabines NB3, as colônias são inseridas em microtubos com tampas rosqueável para posteriormente serem inativadas por meio de aquecimento a 95°C por 1 hora. Então, as amostras são centrifugadas e lavadas duas vezes em água, para depois serem vortexizadas com miçangas (*beads*) para ruptura das células. Depois de nova centrifugação, a etapa final da extração com ácido fórmico é realizada. Melhor desempenho para identificação de micobactérias é obtido com colônias do meio sólido Lowenstein-Jensen,

já que os EM obtidos de sedimentos de meio líquido *mycobacterium growth indicator tube* (MGIT) são de qualidade inferior¹¹.

Quanto ao tempo de cultura, micobactérias de crescimento rápido e de crescimento lento apresentaram EM de qualidade inferior quando obtidas de colônias de 10 e 28 dias, respectivamente, em comparação àquelas obtidas de cultivos de 72 horas e 9 dias, 96 horas e 14 dias, 7 e 21 dias, respectivamente¹².

Leveduras

Vários parâmetros pré-analíticos foram estudados e comparados para identificação de levedura na plataforma Microflex LT Bruker®. Diferentemente de bactérias Gram-negativas, esfregaços com inóculos leves, obtidos a partir de uma colônia isolada, são necessários para obtenção de melhores resultados. Tempo de incubação de 48 e 72 horas não produziram resultados diferentes¹³. O cultivo em meio cromogênico é recomendado para certificação da pureza das colônias e parece ter desempenho superior quando comparado com meio Sabouraud para identificação de leveduras por EM MALDI-TOF¹⁴. No entanto, a análise de células intactas tem desempenho inferior para identificação de leveduras em comparação com protocolos de extração com ácido fórmico. Entre os protocolos com extração, a extração completa em tubo com etanol e ácido fórmico produz resultados superiores¹⁴.

Fungos filamentosos

A identificação de fungos filamentosos pode ser realizada a partir de colônias obtidas em meios sólidos, sem a necessidade de cultivo em meio líquido como preconizado pela Bruker®. Cassagne et al. avaliaram diferentes condições pré-analíticas para identificação de fungos filamentosos; a utilização de colônias com crescimento de pelo menos 72 horas em ágar Sabouraud apresentou EM de melhor qualidade em comparação àqueles obtidos após 24 horas de incubação. Aquecimento a 95 °C antes da extração produziu resultados inferiores aos protocolos de extração com etanol e AF sem tal procedimento¹⁵.

PARÂMETROS PÓS-ANALÍTICOS

Os resultados fornecidos pelos diferentes aparelhos após a comparação do EM do analito com os ER das bases de dados são reportados como aceitáveis ou não de acordo com fluxogramas estabelecidos pelos fabricantes. Os resultados julgados insuficientes para identificação de espécie, com valor de LS inferior a 2 pelo *software* Biotyper® ou *low discrimination* (duas ou mais espécies com ID > 60%) fornecido pelo Myla® não devem ser descartados em análise ini-

cial. Por exemplo, para identificação de leveduras, os resultados reportados pelo Biotyper® são frequentemente inferiores a 2 para análises de esfregaços com extração de ácido fórmico na placa, mas quando os dois maiores valores (acima de 1,7) de LS fornecidos são da mesma espécie e há correlação com dados fenotípicos (p.ex., *C. albicans* e colônias verdes em ágar cromogênico), o resultado pode ser aceito¹⁴. De maneira similar, para identificação de BGN.

Pela similaridade dos EM, erros de identificação para as espécies *Escherichia coli* e *Shigella sonnei* com o *database* comercial Biotyper® podem acontecer e o microbiologista deve utilizar dados fenotípicos antes de reportar o resultado de identificação⁴. A similaridade entre os EM de *S. pneumoniae* e *S. mitis* pode estar relacionada a erros de identificação pela EM MALDI-TOF. Schulthess et al. compararam os resultados obtidos por meio do MALDI-TOF Bruker® (*software* Biotyper®3.0) de 1.619 CGP com identificação fenotípica convencional e sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal e estabeleceram um fluxograma pós-analítico resumido na Figura 1¹⁶.

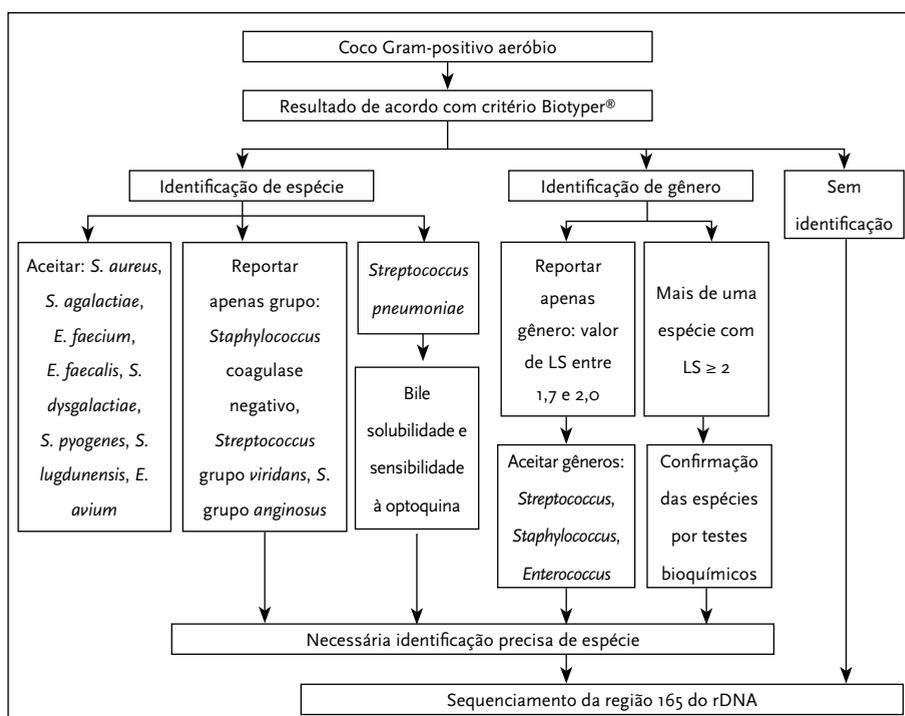


FIGURA 1 Fluxograma pós-analítico para identificação de cocos Gram-positivos aeróbios pelo aparelho Microflex LT, *software* Biotyper 3.0^{®16}.

Contudo, o fluxograma não se aplica aos resultados fornecidos pelo VITEK MS®. Estudo recente analisou o desempenho do VITEK MS® para identificação de *Streptococcus* do grupo *viridans*, incluindo *S. mitis*, e *S. pneumoniae*, sendo que todos os 95 isolados de *S. pneumoniae* foram corretamente identificados e apenas um *Streptococcus* do grupo *viridans*, entre 116, foi incorretamente classificado como *S. pneumoniae*¹⁷.

O mesmo grupo que estabeleceu um fluxograma de identificação de CGP pelo aparelho da Bruker equipado com o programa Biotyper 3.0 estabeleceu recentemente um algoritmo para identificação de bacilos Gram-positivos (BGP)⁸.

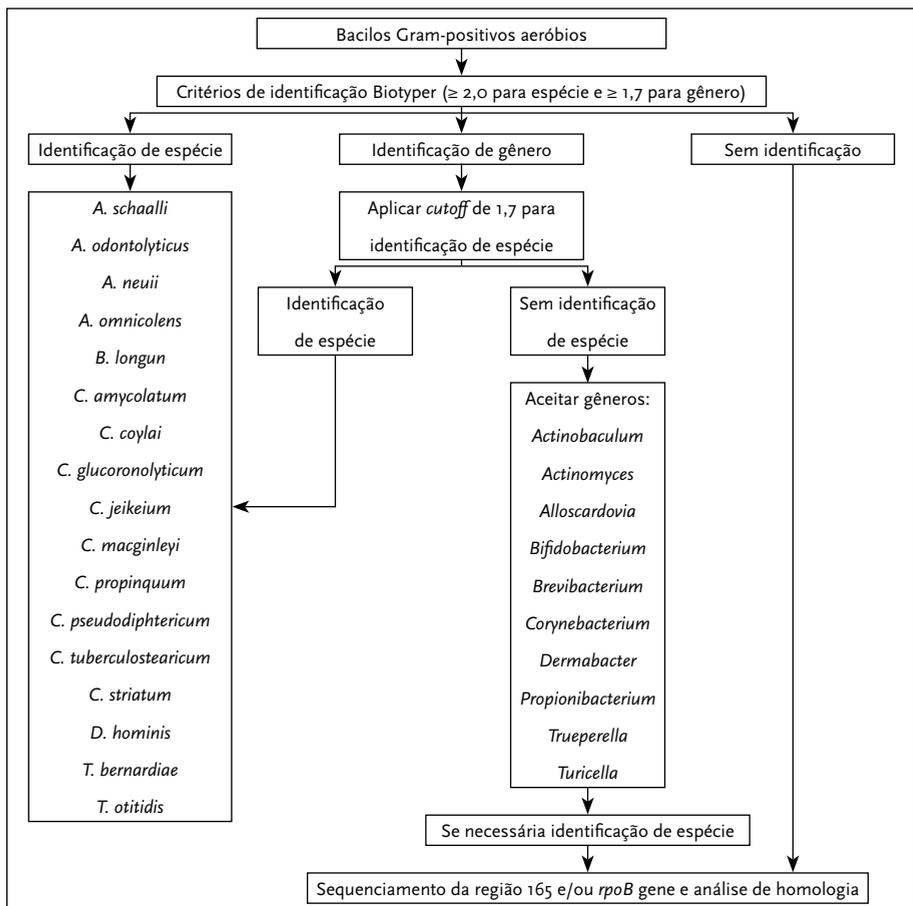


FIGURA 2 Fluxograma pós-analítico para identificação de bacilos Gram-positivos aeróbios pelo aparelho Microflex LT, software Biotyper 3.0®⁸.

Para identificação de BGNF, a adoção de valor de LS de 1,9 como *cutoff*, e não 2,0 como recomendado pela Bruker®, pode aumentar o percentual de identificações de espécie sem produzir erros de caracterização de espécie⁷. De maneira similar, para CGP, a adoção de um *cutoff* de 1,7 pode aumentar o número de identificações de espécie e gênero aceitáveis. TeKippe et al. analisaram 239 CGP e, ao adotarem um *cutoff* de 1,7, obtiveram 15,5% de aumento no número de identificações de gênero e 14,3% para identificação de espécie. O impacto positivo pode ser notado de maneira mais expressiva para *Staphylococcus* spp.⁶

Para identificação de micobactérias, a diminuição do *cutoff* também tem impacto positivo com aumento do percentual de identificações consideradas corretas. Mather et al. analisaram 198 isolados clínicos de micobactérias e encontraram que, ao abaixar o *cutoff* de 2,0 para 1,7 como critério de aceitabilidade de identificação de espécies pelo software Biotyper®, houve aumento de 80 para 90% de identificações corretas¹². Controle de qualidade dos resultados fornecidos pela EM MALDI-TOF deve ser realizado, já que fatores como realização inadequada do esfregaço ou má limpeza da placa (Bruker®) podem prejudicar a leitura dos analitos. Problemas técnicos e falta de manutenção também estão relacionados à queda da qualidade dos resultados². Os aparelhos devem ser rotineiramente calibrados com a utilização do BTS (Bruker®, extrato de *E. coli* liofilizada, RNase A e mioglobina) ou com *E. coli* ATCC 8739 (bioMérieux®). Os aparelhos devem ser localizados em locais limpos livres de poeiras que podem se acumular nas juntas plásticas e dificultar a criação do vácuo. A fonte de *laser* deve ser limpa periodicamente, já que há acúmulo de detritos produzidos pela ionização do analito embebido pela matriz². Um exemplo de controle de qualidade interno para as identificações produzidas pela SM MALDI-TOF foi descrito por microbiologistas do Hospital Universitário de Lausanne, Suíça². Semanalmente, são analisadas duas cepas ATCC, uma de *E. coli* e outra de *S. aureus*, que possuem 81 e 80 picos conservados, respectivamente. EM de qualidade das duas cepas contém todos os picos conservados. Conforme exposto na Figura 3, entre as semanas 1 e 3, houve queda da qualidade dos EM obtidos, com menor percentual dos de expressão dos picos conservados. Investigação causal revelou que entre essas semanas o profissional estava em treinamento, produzindo esfregaços de baixa qualidade².

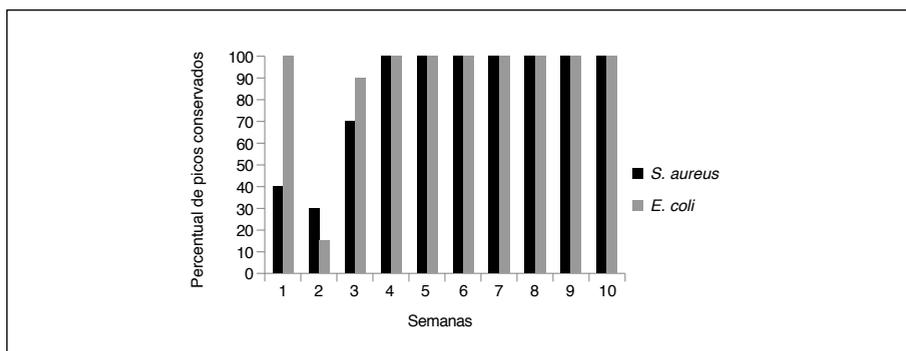


FIGURA 3 Exemplo de controle de qualidade interno para EM MALDI-TOF².

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A SM MALDI-TOF é uma nova e potente ferramenta para identificação de micro-organismos, porém a adoção de parâmetros pré e pós-analíticos específicos para cada grupo de patógenos é essencial para a obtenção de melhor desempenho. No entanto, para a identificação de espécies raras, as bases de dados ou *databases* carecem de qualidade/quantidade de ER. Algumas espécies filogeneticamente próximas podem não ser distinguidas pelas ferramentas disponíveis nas plataformas comerciais.

A maioria das evidências disponíveis na literatura é referente à plataforma do fabricante Bruker®, que, na maioria das vezes, não são extrapoláveis para a plataforma VITEK MS® (bioMérieux), a única com autorização pela Anvisa para utilização em laboratórios clínicos.

Bactérias Gram-positivas possuem EM de melhor qualidade obtidos após extração com ácido fórmico.

Actinomicetos aeróbios e fungos precisam de etapa de extração para obtenção de EM de melhor qualidade. Há protocolos específicos para cada grupo de micro-organismos.

Controle de qualidade é essencial e ajuda a monitorar o desempenho das plataformas de SM MALDI-TOF para identificação dos patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kok J, Chen SCA, Dwyer DE, Iredell JR. Current status of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Pathology (Phila)* 2013;45(1):4-17.

2. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36(2):380-407.
3. Carbonnelle E, Nassif X. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. *Médecine Sci MS* 2011;27(10):882-8.
4. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(3):547-603.
5. De Almeida Júnior JN, Figueiredo DSY, Toubas D, Del Negro GMB, Motta AL, Rossi F et al. Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2013.
6. McElvania Tekippe E, Shuey S, Winkler DW, Butler MA, Burnham C-AD. Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1421-7.
7. Ford BA, Burnham C-AD. Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1412-20.
8. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52(4):1089-97.
9. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4015-21.
10. Fournier R, Wallet F, Grandbastien B, Dubreuil L, Courcol R, Neut C et al. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2012;18(3):294-7.
11. Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4481-6.
12. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol* 2014;52(1):130-8.
13. Goyer M, Lucchi G, Ducoroy P, Vagner O, Bonnin A, Dalle F. Optimization of the pre-analytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. *J Clin Microbiol* 2012;50(9):3066-8.

14. Cassagne C, Cella A-L, Suchon P, Normand A-C, Ranque S, Piarroux R. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol* 2013;51(4):371-7.
15. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PloS One* 2011;6(12):e28425.
16. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1834-40.
17. Branda JA, Markham RP, Garner CD, Rychert JA, Ferraro MJ. Performance of the Vitek MS v2.0 system in distinguishing *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal species of the *Streptococcus mitis* group. *J Clin Microbiol* 2013;51(9):3079-82.

9. Infecções bacterianas emergentes

INTRODUÇÃO

As infecções emergentes são doenças de origem infecciosa, cuja incidência vem aumentando. São um problema de saúde pública e uma das principais causas de mortalidade e morbidade em nível mundial.

Podem ser consideradas como emergentes (agente infeccioso identificado pela primeira vez nas últimas décadas) ou reemergentes. Por exemplo, a infecção por HIV é considerada emergente, assim como os vírus da gripe aviária ou a síndrome respiratória aguda grave associada a coronavírus (*severe acute respiratory syndrome* – SARS).

A malária, a tuberculose ou o carbúnculo (*anthrax*) são exemplos de doenças infecciosas reemergentes, sendo esta última considerada “deliberadamente” reemergente, no âmbito do bioterrorismo.

Vários fatores facilitam aos agentes infecciosos alcançarem novos nichos ecológicos e adaptarem-se a novos hospedeiros. Esses fatores incluem mutações e recombinações genéticas, alterações nas populações de hospedeiros, novos reservatórios ou vetores intermediários, alterações ecológicas, demográficas e comportamentais, assim como a circulação internacional de indivíduos e bens. Pode-se considerar até mesmo fatores políticos, como a contenção no financiamento de medidas de proteção em saúde pública.

Entre as doenças infecciosas de origem bacteriana emergentes de maior relevância em saúde pública, podem-se apontar algumas relacionadas ao desenvolvimento tecnológico, como as infecções por micro-organismos resistentes a antimicrobianos, problema em parte decorrente do uso inadequado desses

medicamentos, refletindo, até certo ponto, a qualidade da assistência médica, com sérios reflexos na morbidade e mortalidade hospitalar e no custo dos serviços.

Infecções transmitidas por alimentos têm aumentado significativamente sua importância à medida que se amplia o uso de alimentos industrializados. Alimentos de origem animal apresentam risco adicional, pois podem ser veículo de transmissão de micro-organismos resistentes a antimicrobianos quando originários de rebanhos alimentados com ração em que foram adicionados antibióticos de largo espectro.

Tecnologias recém-introduzidas em produtos de amplo consumo podem dar origem a epidemias cuja etiologia é de difícil identificação. Foi o caso da epidemia da síndrome do choque tóxico entre mulheres em idade fértil, ocorrida nos Estados Unidos no final dos anos 1970, induzida pelo uso de absorventes internos recentemente introduzidos no mercado.

A modificação de comportamento de um agente conhecido também pode criar riscos significativos para a saúde da população. Um exemplo é a febre purpúrica brasileira, causada por um clone do *Haemophilus aegyptius*, bactéria conhecida desde o final do século XIX e associada exclusivamente à conjuntivite purulenta, uma infecção autolimitada. No entanto, por motivos ainda não perfeitamente conhecidos, essa bactéria passou a apresentar uma forma clínica grave com infecção sistêmica e elevada letalidade a partir de meados dos anos 1980. Essa doença foi registrada em alguns estados brasileiros, tanto na forma de casos esporádicos como em epidemias, e seu potencial de expansão ainda está por ser estabelecido.

Os fatores associados à reemergência de doenças infecciosas são muito semelhantes àqueles apontados como associados às doenças infecciosas emergentes. O recrudescimento da tuberculose em várias regiões do mundo, a partir da segunda metade dos anos 1980, que atingiu inclusive países industrializados, é um bom exemplo. Nesse caso, estiveram envolvidas a desestruturação dos serviços de saúde; o aparecimento de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*, fato em parte relacionado ao uso inadequado dos esquemas terapêuticos; a ampliação por motivos políticos e econômicos dos processos migratórios, levando indivíduos originários de países de elevada prevalência a se dirigirem a países industrializados; e, por fim, a coinfeção causada pelo *M. tuberculosis* e pelo HIV. Alguns autores atribuem a este último fator o papel mais relevante no incremento das taxas de tuberculose nos últimos anos.

A tuberculose é um problema grave de saúde pública. Em 2005, foi responsável por 1,6 milhão de mortes mundialmente, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estima-se que 1/3 da população mundial

atualmente esteja infectada pelo bacilo da tuberculose. Em cerca de 90% dos indivíduos infectados (“primo-infecção”), a tuberculose está em latência. Os bacilos permanecem viáveis no interior dos granulomas formados durante a resposta imunitária à infecção inicial.

No entanto, cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados (mas soronegativos para o HIV) vão desenvolver tuberculose ativa, se o seu sistema imunitário estiver deficitário. Nos indivíduos infectados pelo bacilo da tuberculose e, simultaneamente, soropositivos para o HIV, a probabilidade de desenvolver tuberculose ativa é muito superior. A coinfeção de tuberculose e HIV acelera a progressão de ambas as doenças. Foram identificadas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* “multirresistentes” (resistentes simultaneamente a isoniazida e rifampicina, terapêuticas de primeira linha), resultados geralmente de tratamento incompleto (inferior a 6 meses) ou irregular. Tem sido particularmente preocupante a identificação de algumas cepas que apresentam resistência à grande maioria dos fármacos tuberculostáticos.

Para o reaparecimento da difteria nos países que formavam a antiga União Soviética, na forma de extensa epidemia, com dezenas de milhares de casos e milhares de óbitos, nos primeiros anos da década de 1990, após várias décadas de controle da doença (ainda que não se esteja perfeitamente explicado), aceitam-se entre os fatores envolvidos:

1. Aumento de crianças suscetíveis em função da diminuição da eficiência do programa de vacinação.
2. Aumento de adultos suscetíveis por perda da imunidade e ausência de programas de imunização para faixas etárias mais altas.
3. Piora nas condições socioeconômicas.
4. Aumento de fluxos migratórios.

Outra doença passível de prevenção por vacinação que tem apresentado sinais de recrudescimento é a coqueluche, mesmo em países que utilizaram extensivamente a vacina, como Holanda, Canadá e Austrália.

Uma possível explicação seria a ocorrência de progressiva seleção de cepas antigenicamente distintas daquelas utilizadas na produção de vacinas, criando condições para que a doença mantenha-se endêmica a despeito de elevadas coberturas de vacinação.

De acordo com um recente relatório da OMS sobre a situação global da resistência bacteriana aos antimicrobianos, há situações extremamente preocupantes:

- *Escherichia coli*: resistência a cefalosporinas de terceira geração, incluindo resistência estendida a betalactamases de espectro estendido (ESBL) e fluoroquinolonas.
- *Klebsiella pneumoniae*: resistência a cefalosporinas de terceira geração, incluindo resistência estendida a ESBL e carbapenêmicos.
- *Staphylococcus aureus*: resistência a drogas betalactâmicas (oxacilina, metilicina, MRSA) e resistência a vancomicina, descrita recentemente.
- *Streptococcus pneumoniae*: resistência e/ou baixa suscetibilidade a penicilina.
- *Salmonella* não tifoide (NTS): resistência a fluoroquinolonas.
- *Shigella* sp: resistência a fluoroquinolonas.
- *Neisseria gonorrhoeae*: suscetibilidade diminuída a cefalosporinas de terceira geração.

Esses tipos de resistência bacteriana têm impacto significativo em saúde pública, além de contribuir para o aumento da morbidade e mortalidade, em alguns casos, pela absoluta falta de alternativas terapêuticas.

O diagnóstico laboratorial cuidadoso e correto dessas cepas bacterianas é um passo fundamental para prevenir disseminação dessas bactérias por meio das medidas de controle.

CONCEITOS IMPORTANTES SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES (ADAPTADO DE WILSON, 1995)

- A ocorrência de infecções emergentes é um processo dinâmico que resulta de uma sequência de eventos (p.ex., a introdução de um agente potencialmente patogênico em uma nova área geográfica, por meio de viajantes ou migração; a sua adaptação ao novo ecossistema; a presença de um hospedeiro suscetível; a presença de um vetor competente, etc.).
- A maioria das novas infecções não é causada por agentes genuinamente desconhecidos.
- Os agentes infecciosos associados a essas doenças podem ser vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos ou príons.
- O conceito de o agente infeccioso como único responsável pela doença é inadequado e incompleto.
- A situação global na atualidade, resultante da interação de fatores sociais, econômicos, políticos, climáticos, tecnológicos e ambientais, favorece a ocorrência de doenças emergentes, principalmente as infecciosas.

- A intervenção humana é o principal fator desencadeante das doenças infecciosas emergentes.
- O conhecimento profundo e o planejamento de uma estratégia de resposta às infecções emergentes requerem abordagem global, em termos conceituais e geográficos.

PRINCIPAIS INFECÇÕES EMERGENTES

Doenças causadas por vírus

Febre hemorrágica (dengue, ebola, Marburg), encefalite por vírus de West Nile, síndrome respiratória aguda grave (SARS) associada a coronavírus, febre de Lassa, febre de R. Valley e febre amarela, hepatite C, HIV/Aids, vírus da varíola, hantavírus, entre outros.

Doenças causadas por príons

Encefalopatias espongiformes transmissíveis.

Doenças causadas por bactérias

Tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), cólera (*Vibrio cholerae*), doença dos legionários (*Legionella*), úlceras gástricas (*Helicobacter pylori*), colite hemorrágica (*E. coli* O157:H7), doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), *Streptococcus* grupo A e síndrome do choque tóxico, *Staphylococcus aureus*, carbúnculo (*Bacillus anthracis*), novas e cada vez maiores resistências bacterianas, entre outras.

Doenças causadas por parasitas

Malária (*Plasmodium* spp), *Cryptosporidium*, esquistossomíase; leishmaniose (*Leishmania* spp) e outras.

Doenças causadas por fungos

Criptococose (*Cryptococcus neoformans*); candidíase (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, outras inclusive com aparecimento de resistência a antifúngicos), etc.

RESUMO DAS PRINCIPAIS INFECÇÕES EMERGENTES

Na verdade, a denominação “doenças infecciosas emergentes e reemergentes”, aplicada a partir dos anos 1990, reflete a busca de uma nova abordagem, na tentativa de identificar os instrumentos necessários para fundamentar e implementar novas estratégias de controle de doenças, em um mundo em que a

introdução de novos fatores de risco e mudanças das características dos grupos a eles expostos ocorrem com extrema rapidez.

Para responder a esse desafio, é necessário, por um lado, que a sociedade busque cada vez mais a equidade, pois a pobreza extrema ainda apresenta vínculo importante com as doenças infecciosas; por outro, a organização de um sistema de saúde com capacidade de responder a problemas prioritários e emergentes.

Isso somente é possível com serviços de saúde estruturados e planejados de maneira a incorporarem, de forma ágil, novos conhecimentos e tecnologias indispensáveis à elaboração, implementação, avaliação e atualização contínua de estratégias de controle de doenças.

Deve também ser fortalecida a pesquisa não só no âmbito acadêmico, mas no interior do próprio sistema de saúde. Vale salientar que tanto a pesquisa acadêmica como aquela que é atribuída aos institutos de pesquisa vinculados ao sistema de saúde possuem características peculiares e devem desempenhar papéis complementares, merecendo, portanto, políticas bem definidas que fortaleçam seus vínculos de modo a garantir o desempenho desejado.

Tal objetivo pode ser alcançado por meio de sistemas de financiamento e pela avaliação e controle social das instituições envolvidas.

Um instrumento fundamental para o bom desempenho do sistema de saúde no controle das doenças emergentes e reemergentes é a vigilância com forte apoio laboratorial, o que pressupõe a existência de equipes muito bem treinadas em investigações de surtos epidêmicos e no desenvolvimento de pesquisas complementares, assim como na análise sistemática do comportamento dessas doenças, com fundamento no conhecimento científico, com a finalidade de atualizar continuamente as bases técnicas que subsidiam as estratégias de controle.

E como estratégia de vigilância, deve-se estar atento às publicações da área, visando a prevenir e diagnosticar infecções não habituais em cada população.

BIBLIOGRAFIA

1. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 1997;3(3):285-93.
2. Berkowitz R, Chiang WK. Update on emerging infectious diseases: news from the Centers for Disease Control and Prevention. *Ann Emerg Med* 2014;353-5.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Addressing Emerging Infectious Disease Threats. A Prevention Strategies for the United States. 1994.

4. Cockerill FR, Smith T. Response of the clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. *J Clin Microbiol* 2004;42:2359-65.
5. Fauci AS, Touchette NA, Folkers GK. Emerging infectious diseases: a 10-year perspective from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Emerg Infect Dis* 2005;11:519-25.
6. Fauci AS. Emerging infectious diseases – a clear and present danger to humanity. *JAMA* 2004;292:1887-8.
7. Fidler JD. Globalization, international law, and emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1996;2(2):77-84.
8. Frenk J, Bobadilla JL, Sepulveda J, Cervantes ML. Health transition in middle-income countries: new challenges for health care. *Health Policy and Planning* 1998;4(1):29-39.
9. Harrison LH, Broome CV, Ajello G et al. Report of Symposium. Brazilian Purpuric Fever. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8(4):237-49.
10. Henderson DA. Strategies for the twenty-first century – control or eradication? In: Walker DH (ed.). *Global infectious diseases. Prevention, control, and eradication*. New York: Springer-Verlag, 1992.
11. Lederberg J. Infectious diseases – a threat to global health and security. *JAMA* 1996;276(5):417-9.
12. Lederberg J. Infectious diseases as an evolutionary paradigm. *Emerg Infect Dis* 1997;3(4): 417-23.
13. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004;10:122-9.
14. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 2004;430:242-9.
15. Morse SS, Hughes JM. Developing and integrates epidemiologic approach to emerging infectious diseases. *Epidemiol Rev* 1996;18(1):1-3.
16. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995;1:7-15. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/1/1/95-0102.htm>.
17. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995;1(1):7-15.
18. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med* 2014;370(16):1524-31.
19. Satcher D. Emerging infections: getting ahead of the curve. *Emerg Infect Dis* 1995;1:1-6. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/1/1/95-0101.htm>.
20. Stör K. Avian influenza and pandemics – research needs and opportunities. *N Engl J Med* 2005;352:405-7.
21. Tauxe RV. Emerging foodborne: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis* 1997;3(4):425-34.
22. Vitek CR, Wharton M. Diphtheria in the former Soviet Union: reemergence of a pandemic disease. *Emerg Infect Dis* 1998;4(4):539-50.

23. World Health Organization (WHO). Library Cataloguing-in-Publication Data Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int>.
24. World Health Organization (WHO). Leading Causes of Mortality and Burden of Disease Estimates for 1998. World Health Report; 1999.
25. World Health Organization (WHO). Fact sheet n° 104: Tuberculosis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>.
26. World Health Organization (WHO). Fact sheet n° 194: Antimicrobial resistance. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre>.

10. Automação em microbiologia

MICROBIOLOGIA

Início

Em 1881, Robert Koch realizou a primeira descoberta a respeito da bacteriologia, ao descrever “gelatinas” como nutrientes para bactérias. Em seguida (1887), iniciou-se a utilização de placa de Petri e, finalmente, entre 1900 e 1905, iniciou-se o uso de corantes e do ágar MacConkey. Após tantos anos, a placa de Petri continua sendo a principal ferramenta para os laboratórios clínicos, assim como o método de disco-difusão, que ainda é utilizado pela maioria dos serviços após anos de padronização.

As técnicas de estrias em meios sólidos e leituras das placas não sofreram mudanças após muitos anos de uso e as incubadoras, embora mais confiáveis, são essencialmente similares às construídas no início.

Ao longo dos anos, o grande avanço na microbiologia tem sido a introdução dos sistemas automatizados, que fizeram a diferença na identificação correta e na liberação do antibiograma de forma mais rápida e precisa.

Atualidade

Nas últimas décadas, a microbiologia clínica tem avançado em diversos aspectos, seja no reconhecimento de novos agentes etiológicos, na emergência de alguns patógenos clássicos ou no desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico molecular e sistemas automatizados para testes de identificação e suscetibilidade antimicrobiana entre os diferentes micro-organismos envolvidos nas infecções.

Enquanto isso, os laboratórios clínicos têm visualizado um aumento do volume de amostras que são processadas diariamente. Esse avanço na tecnologia

dos laboratórios tem sido associado à melhoria nos sistemas de informática, permitindo a interface entre os diferentes aparelhos, e tem estimulado o surgimento de sistemas automatizados para identificação e testes de suscetibilidade para os micro-organismos mais complexos. Assim, novos sistemas foram idealizados e lançados no mercado, embora cada um apresente características próprias, vantagens e limitações.

Mesmo que os sistemas automatizados disponíveis comercialmente apresentem inúmeras melhorias em relação aos que havia anteriormente, considerados de primeira linha, eles ainda necessitam evoluir para melhor atender as necessidades da microbiologia clínica. Assim, espera-se que as futuras gerações de equipamentos possam ser altamente automatizados, com melhor relação custo-benefício, precisão, confiabilidade, flexibilidade e com menor tempo de resposta.

O processo de identificação de um micro-organismo implica conhecimento prévio de características atribuídas ao patógeno e ao sítio de infecção. O esperado é que as técnicas utilizadas para essa finalidade sigam alguns parâmetros gerais, como: capacidade de identificação universal, baixo custo de operação e propiciar que os dados obtidos possam ser armazenados, viabilizados e que se tornem passíveis de atualizações.

Os primeiros sistemas de identificação bacteriana fabricados foram os Autobac Series II (Organon Teknika) e o Avantage (Abbott Laboratories Diagnostic Divisão), que utilizavam leituras colorimétricas e já não estão mais disponíveis para venda.

Os resultados de identificação obtidos pelo Autobac Series II demonstravam um índice de acerto na identificação de bacilos Gram-negativos variando entre 88 e 95%, entretanto, apresentavam algumas discordâncias entre alguns micro-organismos, como: *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp. Já o Avantage identificava corretamente 95% dos bacilos Gram-negativos testados.

Na avaliação das leveduras, os resultados mostravam que as leveduras mais incomuns foram frequentemente identificadas erroneamente. Apesar das falhas encontradas, esses sistemas pioneiros na identificação foram de extrema importância e serviram de referência para novas metodologias.

Nas últimas décadas, assistiu-se ao surgimento e ao avanço dos sistemas nas diversas áreas do diagnóstico clínico, processo que ocorreu em menor escala na área de microbiologia, em que apenas nos últimos anos têm sido introduzidos, de maneira mais eficaz, sistemas com monitoramento contínuo de crescimento

nas culturas de sangue/hemocultura, sistemas para identificação de bactérias e fungos, além de metodologias para determinação da suscetibilidade antimicrobiana, amplamente utilizadas na rotina dos serviços de microbiologia de médio e grande portes.

Atualmente, além da automação na identificação e teste de suscetibilidade, já estão disponíveis no mercado inoculadoras inteligentes em que as placas são avaliadas em intervalos definidos pelo usuário e a imagem do crescimento bacteriano é projetada utilizando-se câmeras de alta resolução. Após a detecção do crescimento, as imagens geradas podem ser monitoradas pelo profissional auxiliando na decisão da realização de testes adicionais ou mesmo serem enviadas para identificação pelo MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*), sistema de última geração que utiliza a metodologia de espectrometria de massa na identificação rápida e precisa de bactérias e fungos.

Provavelmente, o aspecto mais utilizado dos sistemas automatizados em ambientes hospitalares é o suporte para a prescrição e administração de antibióticos. Tais aspectos têm sido bem analisados em muitos estudos, os quais descrevem que, com a utilização de tais aparelhos, houve melhorias no uso dos antibióticos, por meio de orientações sobre o uso apropriado desses medicamentos. Além disso, foram observadas melhorias do cuidado para com o paciente, redução de custos e estabilização da resistência aos antibióticos.

ESCOLHA DO SISTEMA AUTOMATIZADO NA MICROBIOLOGIA CLÍNICA

A necessidade de automatizar a rotina de microbiologia vem surgindo em função do aumento do número de amostras recebidas diariamente nos laboratórios clínicos. Outro fator relevante é a necessidade de investigações epidemiológicas decorrente do aumento do número de micro-organismos multidroga resistentes e o surgimento de novos mecanismos de resistência, considerados desafios na rotina dos serviços de microbiologia. Assim, a automação tem sido considerada uma solução, desde a fase pré-analítica até a pós-analítica. A possibilidade do uso de códigos de barra permite rastrear as amostras desde a recepção pelo laboratório até a liberação do resultado. Estudos apontam que cerca de 50 a 70% do tempo gasto pela equipe técnica pode ser substituído pelo uso da automação.

Entre os diversos setores dos laboratórios clínicos, a microbiologia clínica é reconhecida como a de menor tecnologia, quando comparada ao elevado grau de automação encontrado no laboratório de forma geral. No entanto, os

sistemas estão emergindo para o laboratório com o potencial para automatizar praticamente todas as áreas, incluindo inoculação de placas de cultura primárias, detecção de crescimento em meios de cultura, testes de sensibilidade e extração e detecção de ácidos nucleicos a partir de amostras clínicas. Como resultado, o fluxo de trabalho no laboratório de microbiologia está mudando em um ritmo rápido, e microbiologistas têm o desafio de escolher o mais adequado, clinicamente útil, e de menor custo para o laboratório.

Algumas observações importantes na decisão de instalar um sistema automatizado seriam tamanho do equipamento; disponibilidade de espaço no laboratório; volume e fluxo de amostras processadas diariamente; e capacidade de interface com o sistema de informática utilizado pelo serviço.

A decisão de implantar ou não um sistema automatizado nos laboratórios depende essencialmente do tamanho do laboratório, volume de amostras recebidas diariamente, orçamento disponível, espaço e metas estabelecidas.

VANTAGENS DOS SISTEMAS AUTOMATIZADOS

A automação em microbiologia clínica permite a identificação precisa de numerosos micro-organismos, muitos dos quais impossíveis de serem identificados por métodos manuais. O tempo necessário para a identificação final da maioria das bactérias ocorre entre 4 e 18 horas de incubação e em até 18 horas para leveduras, antecipando em até 24 horas a liberação de resultados finais, quando comparado às metodologias convencionais. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) são realizados em paralelo com a identificação dos micro-organismos e liberados nos mesmos prazos. O TSA automatizado é liberado não só por categorias – sensível, intermediário ou resistente –, mas também com indicação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco, permitindo a escolha de dosagens mais adequadas para o tratamento do paciente. Além disso, os principais mecanismos de resistência bacteriana, como produção de enzimas tipo betalactamase de espectro ampliado (ESBL) em bactérias Gram-negativas, ou resistências a metilicina e vancomicina em Gram-positivos, são detectados e informados. A padronização envolvida no processo automatizado garante não só rapidez, mas também aumenta a segurança e confiabilidade dos resultados, eliminando a subjetividade das análises manuais.

Outro grande impacto é a redução de pessoal, permitindo o processamento de várias amostras simultaneamente, o que não é possível com mão de obra humana. Além disso, é uma solução para a escassez de técnicos qualificados em microbiologia no mercado.

Em relação ao benefício ao paciente assistido, a automação pode melhorar o atendimento de várias maneiras, incluindo maior rapidez na comunicação dos resultados de culturas positivas e negativas, além do potencial para reduzir o erro humano, por meio da geração de resultados de qualidade, reproduzíveis, rastreáveis e com melhor tempo de resposta. A padronização envolvida no processo automatizado garante não só rapidez, mas também aumenta a segurança e a confiabilidade dos resultados, eliminando a subjetividade das análises manuais.

DESVANTAGENS DOS SISTEMAS AUTOMATIZADOS

O fator de maior limitação na automação dentro do laboratório de microbiologia diz respeito ao alto custo quando comparado com a rotina convencional. Outro ponto crítico a ser cuidadosamente observado é a impossibilidade em fornecer uma CIM exata, na maioria dos casos, pois os sistemas automatizados disponibilizam poucas diluições dos antimicrobianos, e não diluições seriadas como acontece com a metodologia de microdiluição em placa, ou mesmo o gradiente de diluição em ágar, que fornecem uma CIM com maior exatidão. Essa ausência de diluições seriadas pode também gerar resistência ou sensibilidade falsas no resultado final liberado pelo sistema.

Outra consideração importante é a falta de acurácia na detecção da expressão de alguns mecanismos de resistência, principalmente os mecanismos de resistência induzíveis, que demandam maior tempo para sua expressão, de modo que necessitam de complementação por meio de testes fenotípicos e/ou genotípicos para conhecimento exato do mecanismo de resistência envolvido.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS DISPONÍVEIS PARA USO NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Inoculadoras automatizadas

O início do processo de automação na inoculação de placas ocorreu há mais de 20 anos, por meio do lançamento de um sistema limitado, sem possibilidade de interfaces completas, além de apresentar restrições na transferência e inoculação das amostras. Os instrumentos disponíveis hoje, apesar de apresentarem melhores resultados, possuem limitações na inoculação de determinados tipos de amostras, sendo algumas marcas restritas a amostras líquidas, como urina. Outra limitação diz respeito aos tipos de recipientes que são aceitos para processamento. Entre os novos instrumentos disponíveis comercialmente considerados de terceira geração, citam-se Innova® (BD Diagnóstico, Spark),

Inoqula® (Kiestra), Previ® Isola (bioMérieux, Hazelwood), WASP® (Copan Diagnostics, Murrieta).

Ao decidir pela utilização da inoculadora, o serviço deve se basear no número de amostras plaqueadas diariamente, na disponibilidade do sistema no mercado, nas características do instrumento (tipo de sementeira), no objetivo na aquisição do instrumento (uso apenas para urina ou de amostras coletadas em *swab*) e no custo do equipamento. Durante a decisão de implantar um sistema automatizado para inoculação de amostras, deve ser ponderada a impossibilidade de utilização para outras amostras, como cateteres, biópsias e próteses.

Embora o desenvolvimento de inoculadoras automatizadas venha se difundindo no mercado, as etapas de processamento ainda permanecem inalteradas, visto que parte da operação ainda depende do profissional do serviço (separação das placas, seleção das amostras e carregamento do sistema com as placas).

Innova®

Composta de cinco gavetas para colocação de amostras, com capacidade para 40 amostras cada, totalizando 200 amostras. Podem ser utilizados diferentes tipos de placas, incluindo biplacas. O sistema é composto por seis pilhas de placas com 45 em cada. As estrias utilizadas são do tipo padrão com volume de 1,10 e 30 UL.

Inoqula®

Apresenta a possibilidade de inoculação de diferentes amostras clínicas líquidas e plaqueamento de outros tipos de amostras (p.ex., *swabs* de feridas). As estrias são realizadas utilizando um campo magnético com bolinhas de rolamento, possibilitando o inóculo em até cinco placas simultaneamente, podendo inocular até 400 placas/hora. Tem a capacidade de trabalhar com até 30 tipos de meios, incluindo biplacas, e sete tipos de meios em tubos.

Dados de estudos realizados avaliando o desempenho com este processador descrevem que o sistema Inoqula produz colônias mais isoladas que a técnica manual, além de mostrar boa reprodutibilidade.

Previ® Isola

O instrumento é composto por cinco *racks* de diferentes tamanhos, sendo utilizados cinco diferentes diâmetros de tubos. Os tubos devem ser colocados no instrumento destampados. A capacidade total é de 150 placas, distribuídas em cinco cassetes, que comportam 30 placas cada. Também possibilita utilizar

diferentes placas, incluindo biplacas. O sistema é composto de uma pipeta descartável para cada amostra, além de um aplicador tipo “pente” para cada placa, que produz um padrão único de raia. A capacidade máxima é de 180 placas/hora.

WASP®

Este sistema aceita tubos de diferentes tamanhos sem precisar de ajuste manual e tem capacidade para 370 placas. Podem ser utilizados diferentes meios e até biplacas. Utiliza alças reutilizáveis de 1, 10 e 30 UL que são trocas automaticamente. Pode processar além de tubos com urina, amostras em caldo destinadas a subcultivos, assim como *swabs* descarregados em caldo.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS – HEMOCULTURAS

As infecções de corrente sanguínea estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade; nesses casos, a administração precoce da terapia empírica adequada é necessária para a sobrevivência dos pacientes. Portanto, a hemocultura é considerada um exame de grande importância dentro da microbiologia, sendo vital assegurar o crescimento, a identificação correta e a realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos o mais rápido possível.

A introdução dos sistemas automatizados para realização de hemocultivos produziu grandes avanços dentro do laboratório de microbiologia e no diagnóstico precoce das infecções de corrente sanguínea. O grande impacto dentro do laboratório foi a eliminação de repiques sucessivos sem evidência de crescimento bacteriano, redução do risco de acidentes por punção, diminuição do tempo de incubação, que passou de 7 para 5 dias, detecção precoce da positividade dos frascos, além da disponibilidade de dados epidemiológicos do serviço. Vários estudos descrevem que a utilização dos sistemas automatizados, com monitoramento contínuo e redução do tempo de incubação, é suficiente para detectar a maioria das bacteremias, além de diminuir o isolamento dos micro-organismos considerados contaminantes (principalmente *P. acnes*). Alguns autores sugerem a incubação de 3 dias, pois mais de 98% das verdadeiras bacteremias apresentam crescimento do micro-organismo nesse período.

Os sistemas automatizados para cultura de sangue quase que em sua totalidade utilizam uma metodologia baseada em métodos colorimétricos ou fluorométricos, que detectam a presença de CO₂, quando ocorre aumento da sua concentração na presença do crescimento dos micro-organismos, mudança de pH ou mudança do potencial de redox. Consistem em frascos com diferentes meios de culturas, destinados ao isolamento de micro-organismos distintos

(aeróbicos, anaeróbicos, fungos e micobactérias), compostos de resinas que captam antibióticos e são capazes de melhorar a recuperação de bactérias. Os frascos são incubados nos equipamentos com agitação constante das amostras, acoplados a modernos sistemas de detecção do crescimento microbiano.

Equipamentos automatizados estão sendo utilizados para a detecção rápida da presença de micro-organismos presentes em amostras de sangue, cuja principal vantagem, em comparação com métodos manuais, é a monitoração constante das amostras, a cada 10 minutos durante as 24 horas do dia, com aviso imediato em caso de positividade, o que em muitos casos ocorre antes mesmo de completar 24 horas de incubação. O tempo de incubação necessário até uma hemocultura tornar-se positiva é diretamente proporcional ao número de micro-organismos presentes por mL de sangue. Outra vantagem é a disponibilidade de frascos para hemoculturas contendo meios especiais para o isolamento de micro-organismos fastidiosos, anaeróbios e leveduras, mesmo na presença de antibióticos, pois estes são inativados por resinas especiais presentes no meio.

Impacto da automação para hemoculturas

O impacto da implantação da automação destinada às hemoculturas quando comparada à metodologia convencional pode ser avaliado como um grande benefício em quatro aspectos: clínico, microbiológico, epidemiológico e econômico.

Quando se avalia o benefício clínico, observa-se que a monitoração e agitação intermitente dos sistemas contribuem para maior velocidade de detecção do micro-organismo, associada com redução do tempo de resposta, contribuindo para a melhoria da capacidade de diagnosticar bacteremias e uso racional de antimicrobianos. Quanto ao impacto microbiológico dentro do laboratório, o mais marcante é a diminuição da carga de trabalho, diminuição da contaminação e aumento na detecção dos micro-organismos.

Apesar do aumento do custo de frasco em relação ao frasco convencional, os grandes benefícios econômicos são: diminuição da mão de obra, diminuição dos repiques e, conseqüentemente, de meios e diminuição do risco de acidente com perfurocortantes.

Sistema para hemocultivos – Becton Dickinson (BD)

O BACTEC™ FX é o sistema automatizado da BD, com leitura por fluorescência, destinado a hemocultivos de fungos, micobactérias, bactérias aeróbias e anaeróbias, o que aumenta a eficácia no laboratório. O sistema trabalha com

agitação e monitoramento contínuo dos frascos, sinalizando positividade dos frascos sem interrupção. Os frascos contêm resinas que podem reduzir o tempo de detecção, além de terem a capacidade de se ligar a antibióticos, a exemplo dos aminoglicosídeos, entretanto, alguns estudos apontam para uma rápida e eficaz redução das concentrações de outros antimicrobianos, como flucloxacilina, cefamandole, gentamicina e teicoplanina.

Sistema para hemocultivos – bioMérieux

O Bact/alert (bioMérieux) é um sistema destinado à realização de hemoculturas com metodologia de leitura colorimétrica, que realiza leituras contínuas dos frascos e possui um sistema de alerta em casos de positividade. A detecção do sistema é feita por três tipos de medição:

- Nível de CO₂ presente no frasco.
- Taxa de produção de CO₂.
- Aceleração dessa taxa.

A combinação das três medidas permite ao sistema um elevado grau de exatidão e especificidade.

São incorporadas nos frascos resinas que podem reduzir a ação de antimicrobianos (degradação da droga), podendo acontecer diminuição da atividade em 80 a 90% dentro de 2 horas. Essa redução melhora a habilidade de recuperar micro-organismos aeróbios e facultativos em pacientes recebendo terapia antimicrobiana.

Vantagens dos sistemas para hemoculturas

As principais vantagens dos sistemas de hemocultivos são:

- Monitoramento contínuo das amostras pelo sistema.
- Sensibilidade e rapidez na detecção de amostras positivas.
- Criação de dados epidemiológicos com diferentes bancos de dados.
- Interface com outros sistemas do laboratório.
- Menor manipulação das amostras pela equipe.
- Menor risco de acidente de trabalho.
- Determinação do tempo de positividade, podendo auxiliar no conhecimento das infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateter.

CULTURAS DE AMOSTRAS DIVERSAS – MICOBACTÉRIAS – MGIT (BD)

A detecção de micobactérias pela metodologia da BD pode ser realizada a partir de amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares (exceto sangue), além da capacidade de liberação do teste de sensibilidade a antibióticos para *Mycobacterium tuberculosis*. As leituras utilizam a metodologia de fluorescência e são realizadas de maneira contínua e simultânea. A cada 60 minutos, um ciclo de leitura é fechado. As culturas positivas são imediatamente indicadas por meio de sinais luminosos e alarmes sonoros. Esse sistema possibilita a emissão de resultados de detecção e testes de sensibilidade em menor tempo do que os métodos convencionais.

Na determinação do teste de suscetibilidade, é utilizado o *kit* BD BACTEC™ MGIT™ PZA, cujos resultados são emitidos entre 4 e 21 dias. O teste é baseado no crescimento de um isolado de *M. tuberculosis* em um tubo contendo a droga, comparado a um tubo-controle de crescimento (sem droga). O sistema utiliza monitoramento contínuo, simultâneo e automático dos tubos, por meio de método fluorescente, com resultados altamente sensíveis.

COLORAÇÃO (GRAM) bioMérieux®

É um sistema de coloração para metodologia de Gram, podendo ser utilizadas amostras diversas, além da capacidade de liberação de resultados rápidos e padronizados. O sistema é composto por um pulverizador que dispensa o volume determinado após a padronização da quantidade de reagentes que devem ser dispensados, realizada pelo operador. As lâminas são colocadas separadamente em um carrossel e o aparelho é ligado. A liberação das lâminas coradas e secas leva de 3 a 5 minutos, otimizando o tempo de liberação do exame.

Entre as vantagens do sistema, pode-se apontar o uso de recipientes fechados, que evita a exposição do operador, diminuindo a toxicidade dos reagentes, especialmente cristal de violeta, além da não liberação de resíduos no ambiente, pois possui o recipiente do resíduo fechado.

SISTEMAS PARA IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Basicamente, o diagnóstico microbiológico é sustentado por duas informações fundamentais: a identificação do micro-organismo que está relacionado com

a infecção e o suporte para a melhor opção terapêutica, por meio do teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Os métodos automatizados e os sistemas especializados (do inglês *expert systems*) são amplamente utilizados para identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, para o diagnóstico microbiológico e auxílio do diagnóstico clínico em diversas infecções, como pneumonias, bacteremias, infecções do trato urinário, entre outras.

A primeira etapa de identificação de um micro-organismo consiste em inocular a amostra clínica em meios de cultura, garantindo o isolamento do micro-organismo para análise. Entre os métodos automatizados disponíveis para este fim, os mais utilizados são: o sistema Vitek 2, Microscan e Phoenix, que realizam a identificação microbiológica por meio de provas bioquímicas convencionais, além de liberar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos por meio da monitoração da cinética do crescimento bacteriano e cálculo da concentração mínima inibitória (CIM), que são transcritas em categorias clínicas baseadas em pontos de interrupções interpretativos para métodos de microdiluição.

O uso desses instrumentos permite a execução dos testes de suscetibilidade com mais rapidez, por meio da avaliação de mais do que duas diluições, que representam as concentrações referentes aos limites de sensibilidade ou resistência de cada antimicrobiano.

Phoenix™

Sistema para identificação e antibiograma para diferentes bactérias e fungos leveduriformes, que utiliza diversos indicadores colorimétricos e fluorométricos para identificação. Os testes de identificação baseiam-se na utilização e degradação de substratos específicos pelos organismos, detectadas por diversos sistemas indicadores. O teste de sensibilidade do sistema é baseado na metodologia de microdiluição em caldo e determina o crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações do agente antimicrobiano nos poços dos painéis, que são continuamente incubados e lidos.

O Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) utiliza um sistema especializado baseado em regras chamado BDXpert. A base dessas regras compreende dados atuais da literatura científica, assim como do CLSI, EUCAST e CA-SFM. O BDXpert oferece recomendações especializadas sobre resultados de testes específicos, CIM, fenótipos no geral ou uma combinação deles. Antes de os resultados serem avaliados por mecanismos de inferência, as CIM são trans-

critas em categorias clínicas, baseando-se em pontos de corte interpretativos para métodos de microdiluição em caldo.

O sistema BDXpert é um *software* baseado em regras que fornece recomendações de especialistas com base em resultados de identificação (ID) e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) obtidos por microdiluição em caldo com o sistema Phoenix. O BDXpert pode alterar certas interpretações de acordo com o padrão selecionado, mas os resultados da CIM nunca são alterados. A maioria das regras do BDXpert pode ser ativada ou desativada e definida para disparar automaticamente ou manualmente. A distribuição do relatório final especializado por meio da interface com o sistema de informação laboratorial (SIL) facilita a comunicação para auxiliar o clínico na seleção de terapia medicamentosa apropriada.

O Phoenix, assim como os outros sistemas, apresenta a habilidade de detectar distintos mecanismos de resistência, além dos marcadores de resistência, que são associados a alarmes configurados no sistema e que são informados aos usuários.

- ESBL: *extended spectrum beta-lactamase* (betalactamase de espectro ampliado – com teste confirmatório).
- *Staphylococcus* produtor de betalactamase.
- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (oxacilina).
- VRE: *Enterococcus* resistente à vancomicina.
- HLAR: altos níveis de resistência a aminoglicosídeos – gentamicina: HLGR; estreptomicina: HLSR; kanamicina: HLKR.
- Altos níveis de resistência a macrolídeos em estreptococos (*Efflux/MLSb*).
- Altos níveis de resistência à penicilina em *S. pneumoniae*.
- Baixos níveis de resistência à penicilina em *S. pneumoniae*.

VITEK 2 (bioMérieux®)

O sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux) foi criado na década de 1960 com o objetivo de detectar e identificar agentes patogênicos diretamente da urina de astronautas no espaço. Posteriormente, em 1976, foi modificado para ampliar seu uso na microbiologia clínica. O sistema trabalha com cartões com capacidade de identificar grande número de micro-organismos, além de cartões para determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos, tanto para bactérias Gram-positivas e negativas como para leveduras. Os resultados são liberados com média de tempo que varia de 4 a 24 horas, dependendo do micro-organismo avaliado. Atualmente, estão disponíveis mais de 40 antibióticos entre os diversos cartões,

com resultados que incluem a CIM, bem como as categorias de interpretação da suscetibilidade, seguindo os comitês de padrões de laboratórios clínicos.

Os cartões destinados à identificação dos micro-organismos contêm substratos bioquímicos e um poço de controle de crescimento, além de marcadores de resistência. Na base de dados, encontram-se informações para identificações de membros da família *Enterobacteriaceae*, além de espécies de não fermentadores, diferentes Gram-positivos (*Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp), além de bacilos Gram-positivos (*Listeria monocytogenes*, *Aerococcus*, *Corynebacterium* spp, entre outros), anaeróbios, *Haemophilus* spp, *Neisseria* spp e fungos leveduriformes (*Cryptococcus* spp, *Candida* spp, *Rhodotorula* spp, *Geotricum* spp, *Trichosporon* spp). Em 1989, a base de dados do sistema foi expandida e incluiu *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis* e *Vibrio vulnificus*.

A identificação final ocorre em 4 a 18 horas, dependendo do micro-organismo inoculado, exceto no caso dos fungos leveduriformes, que podem necessitar de 24 horas ou mais para serem identificados. O resultado da leitura dos testes é comparado com uma base de dados e a liberação é feita baseada em suas probabilidades absolutas, liberando os resultados em percentuais. Erros de identificação podem ocorrer por conta de culturas mistas ou ausência do micro-organismo na sua base de dados ou por reações bioquímicas incorretas para certos compostos, como adonitol, arginina, citrato, H₂S e malonato.

A identificação de Gram-positivos pode apresentar percentual de acerto variando de 88 a 100% entre as diferentes espécies, especialmente entre *Staphylococcus coagulase* negativos. Entre os *Streptococcus agalactiae*, o sistema apresenta precisão na identificação que pode variar entre 86 e 100%; *Streptococcus pyogenes* e espécies de *Streptococcus* do grupo D e *Enterococcus* spp apresentam identificação com alto nível de confiança, entretanto, os *Streptococcus* beta-hemolíticos C, F e G podem variar de 36 a 76%; *Streptococcus pneumoniae*, 77%; grupo *viridans*, 57 a 79%; *Listeria monocytogenes* e *Aerococcus* spp, 84 a 100% de acerto na identificação.

A identificação de fungos leveduriformes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *R. rubra*, *S. cerevisiae*) é considerada com resultado de alta confiabilidade, apresentando variação entre 85 e 99% entre as diferentes espécies, especialmente as espécies clínicas com maior prevalência nas infecções.

O sistema Vitek 2 possui uma identificação microbiana abrangente, embora como todo sistema necessite de aperfeiçoamento na identificação de micro-organismos incomuns na rotina, além de ser necessário diminuir o tempo

para a identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores, bactérias Gram-positivas e leveduras.

Na liberação do antibiograma, os resultados são avaliados pelo sistema especializado avançado (SEA), que fornece leitura interpretativa padronizada dessas CIM. Ao contrário de outros sistemas especializados, o SEA é baseado em uma ampla base de conhecimento que compreende mais de 2.000 fenótipos e 20.000 distribuições de CIM obtidas de relatórios publicados a partir da opinião de especialistas, com suas próprias bases de dados de fenótipos e dados *in-house* da bioMérieux. Para cada um dos fenótipos reconhecidos, um intervalo de CIM é determinado e uma distribuição de CIM é definida.

Na etapa de interpretação terapêutica, a SEA atribui uma categoria clínica interpretativa (suscetível, intermediário ou resistente) por meio da utilização de uma das cinco orientações de interpretação padrão: CLSI, DIN, CA-SFM, resistência fenotípica ou resistência natural. Com determinados fenótipos, a SEA também pode sugerir uma correção terapêutica. Nesse caso, os nomes das espécies e os valores numéricos das CIM não são alterados, mas a interpretação, sim. Desde que as correções terapêuticas não impliquem erros nos dados, o SEA pode sugerir múltiplas correções terapêuticas para um isolado único. Isolados para os quais foram sugeridas as correções biológicas ou terapêuticas requerem intervenção humana para decidir se as correções devem ser aceitas.

O sistema do Vitek 2 tem pelo menos uma atualização de *software* por ano, que inclui modificações do sistema especializado.

Sensititre

O Sensititre (Radiometer América, Inc.) é um sistema fluorogênico modular que apresenta a capacidade de realizar identificação de bactérias Gram-negativas (enterobactérias e não fermentadores) e realiza teste de suscetibilidade com determinação da CIM para Gram-positivos e Gram-negativos, em uma variação de 5 a 18 horas. O sistema é composto por um banco de dados que permite gerar, além dos resultados com a interpretação, análise de dados que podem ser utilizados na confecção de relatórios epidemiológicos. A leitura é realizada com a utilização de substratos marcados com fluorescência detectados por meio de um nefelômetro.

Estudos realizados para avaliar a precisão na identificação de micro-organismos pelo Sensititre apresentaram resultados para identificação de enterobactérias com 93,3% de acerto; já para os não fermentadores foi observado um percentual de 71% de acerto.

Por causa de algumas limitações do sistema, maior confiabilidade na identificação dos micro-organismos é alcançada se a identificação ocorrer em nível de gênero e espécie. Existe a necessidade da expansão do sistema na capacidade de identificação rápida para bactérias Gram-positivas, anaeróbios e leveduras.

Osiris (Bio-Rad)

Osiris é um sistema para leitura e interpretação dos tamanhos das zonas de inibição obtidos por meio de testes de disco-difusão. O aparelho realiza leitura e interpretação, além de armazenar os dados no módulo *Extended Expert*. Este sistema pode identificar mais de 2.700 fenótipos de resistência clinicamente significativos, incluindo ESBL, MRSA e *Enterococcus spp* resistentes à vancomicina (VRE), além de especificar o resultado em suscetível, intermediário e resistente. O Osiris apresenta um sistema que é atualizado regularmente, de acordo com as diretrizes da CLSI, com dados da literatura e com a opinião de especialistas em microbiologia.

Em trabalhos para avaliar a eficácia do sistema especializado expandido (SEE) do Osiris para identificação de fenótipos de suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* aos betalactâmicos, os autores concluíram que o SEE do Osiris é uma ferramenta eficaz para a identificação de fenótipos de resistências aos betalactâmicos, entre esses micro-organismos, alcançando percentual de acerto de 78% das amostras testadas.

WalkAway 96 e 40/autoSCAN-4 (Siemens)

Os sistemas WalkAway 40, 96 SI e autoSCAN-4 (Siemens, Healthcare Diagnostics, Deerfield, II) utilizam placas de microdiluição em caldo para determinar a ID e o TSA. Os painéis utilizados são os Synergies Plus, os quais combinam uma rápida ID (2,5 horas) com resultados de TSA lidos praticamente no momento em que são preparados e também após incubação *overnight* (4,5 a 16/18 horas, respectivamente). Outros painéis determinam os pontos de corte das suscetibilidades ou confirmam a presença de ESBL, enquanto painéis cromogênicos são utilizados para a identificação de leveduras e organismos fastidiosos.

Os sistemas WalkAway e autoSCAN-4 utilizam painéis com leitura fluorométrica, com capacidade de interpretação dos testes bioquímicos e de suscetibilidade aos antimicrobianos, cujos resultados são liberados em categorias de interpretação de suscetibilidade por meio da CIM, seguindo os padrões internacionais de interpretação.

Apresenta a habilidade de realizar testes de identificação e antibiograma para bactérias Gram-negativas, Gram-positivas para as famílias *Micrococcaceae* e

Streptococcaceae, além de *L. monocytogenes*, anaeróbios, fungos leveduriformes, *Haemophilus* spp e *Neisseria* spp, por meio de painéis convencionais, com resultados liberados em 15 a 24 horas, e painéis fluorogênicos, com resultados de identificação que variam entre 3 e 7 horas.

Na identificação de *Haemophilus* spp e *Neisseria* spp, apresenta a possibilidade de identificação de sete biótipos para *H. influenzae*, *H. aphrophilus*, *H. parainfluenzae* (quatro biótipos), *H. haemolyticus*, *H. paraphrophilus*, quatro espécies de *Neisseria*, além de *Moraxella catarrhalis*.

Para os micro-organismos da classe dos anaeróbios, existe a possibilidade de identificação de 21 anaeróbios Gram-negativos, 13 Gram-positivos não formadores de esporos, cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-positivos formadores de esporos em apenas 4 horas de incubação.

Na identificação de fungos leveduriformes, apresentam informação de identificação de 16 espécies de *Candida* spp, 8 *Cryptococcus* spp e 11 gêneros de espécies de leveduras.

Estudos comparativos com o sistema API 20E apresentaram resultados mostrando o autoSCAN com a capacidade de identificar corretamente 95% em nível de gênero e 95% para espécies, entre as enterobactérias. No entanto, alguns dados demonstram que o sistema pode necessitar de testes complementares e inspeção visual do operador para identificação correta em 8,9% das enterobactérias e 7,6% de todos os isolados. No grupo dos não fermentadores, esse percentual pode chegar a 21% para as *P. aeruginosa*.

Quando avaliada a acurácia do sistema para os resultados de Gram-positivos, foram observados que 83,4% dos estafilococos coagulase negativos apresentaram excelente identificação, com exceção de *S. hominis*, que apresentou um percentual de acerto de 35,2%.

Avaliando os painéis de leveduras e comparando com a identificação pelo API 20C, foi descrita uma concordância que varia entre 65 e 95% entre os fungos testados, em especial *Cryptococcus* spp e *Candida* spp. Testes suplementares e até inspeção visual foram necessários em 21% dos isolados de fungos leveduriformes.

O software *LabPro Alert System* complementa o sistema *LabPro Information Management*, automatizando a detecção de resultados atípicos ou condições que justificam o controle de infecção ou de revisão médica. Regras são personalizáveis, e o *Alert RuAlert Resolution History* mantém os registros de ações tomadas pelo laboratório para confirmar e finalizar os resultados atípicos. As regras especializadas são atualizadas para cada atualização do software e do painel.

Os sistemas automatizados da MicroScan tem a capacidade de identificar uma ampla variedade de micro-organismos, entretanto, algumas melhorias na base de dados e no *software* para os painéis são necessárias.

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS SISTEMAS AUTOMATIZADOS (IDENTIFICAÇÃO E ANTIBIOGRAMA) – AVALIAÇÃO DE ALGUNS ESTUDOS

Os sistemas disponíveis para identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentam algumas variações, seja no grau de automação, espectro dos micro-organismos ou tempo de resposta. Embora apresentem inquestionável valor dentro do laboratório de microbiologia clínica, ainda existe amplo espaço para melhorias na capacidade de identificação, com um banco de dados maior, menor tempo de resposta e na área de gerenciamento de dados.

Apesar das diferenças entre os sistemas, é difícil para o laboratório a escolha entre eles, em razão do reconhecimento de que a precisão do sistema depende dos organismos testados, que certamente são diferentes entre os diversos estudos disponíveis para consulta, além da diferença de tempo em que os estudos são realizados e dos diferentes laboratórios que participam.

Identificação de *Candida* spp – Vitek 2 × Phoenix

Durante as últimas décadas, o crescente número de hospedeiros vulneráveis, como pacientes criticamente doentes ou imunocomprometidos, resultou na necessidade do diagnóstico preciso das infecções fúngicas, incluindo as causadas por leveduras oportunistas incomuns. Juntamente com *Candida albicans*, a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas, outras espécies de leveduras estão cada vez mais envolvidas nessas infecções. Elas abrangem espécies de *Candida* não *albicans*, incluindo as espécies mais raras *Candida famata*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida rugosa* e *Candida utilis*, bem como espécies raras pertencentes aos gêneros *Trichosporon* spp, *Rhodotorula* spp, *Pichia* spp, *Malassezia* spp e *Saccharomyces* spp.

Recentemente, tem sido observado que algumas espécies de leveduras são altamente virulentas e mostram suscetibilidade reduzida a um ou a vários agentes antifúngicos e que isso gera repercussões clínicas importantes, muitas vezes resultando em falhas terapêuticas. Assim, a identificação correta dessas espécies é de extrema importância, mas esse objetivo é difícil de conseguir, pelo menos usando métodos fenotípicos convencionais.

Uma desvantagem potencial do Phoenix, bem como do sistema Vitek 2, refere-se à incapacidade de discriminar espécies críticas ou intimamente relacionadas dentro dos complexos *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Embora *C. parapsilosis sensu stricto* seja responsável pela grande maioria das doenças humanas associadas com as três espécies de *Candida* do grupo *psilosis*, sabe-se que a *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* mostram perfis de suscetibilidade antifúngica diferentes da de *C. parapsilosis*, que poderia afetar as escolhas terapêuticas.

Com relação ao tempo para a obtenção da identificação final, para o Phoenix, os resultados geralmente estão disponíveis em 4 a 12 horas, enquanto os resultados determinados pelo sistema Vitek 2 ficam prontos em até 18 horas, o que implica, portanto, economia de 6 a 14 horas quando o Phoenix é utilizado.

Em estudos comparando o desempenho dos dois sistemas na identificação de leveduras clinicamente importantes, tanto o sistema de identificação Phoenix como o Vitek 2 mostraram bons resultados com espécies clínicas de leveduras, fornecendo resultados confiáveis e em tempo oportuno, particularmente para Phoenix, em 96,3% e 91,4% dos isolados avaliados. O desempenho do Phoenix mostra ser superior ao do sistema Vitek 2.

Acurácia entre três sistemas para teste de sensibilidade para *P. aeruginosa*

Estudo para comparar resultados dos testes de sensibilidade entre métodos de referência (disco-difusão e microdiluição) e determinação de CIM pela automação para alguns antimicrobianos utilizados para *P. aeruginosa* (aztreonam, cefepime, ceftazidima, imipeném, piperacilina-tazobactam) mostrou resultados com nível inaceitável de erros maiores (falsos-sensíveis) para piperacilina-tazobactam. Menor erro para cefepime foi observado no sistema Vitek 2 e MicroScan; para aztreonam, todos os sistemas apresentaram tendência para falsa resistência; já resultados para imipeném apresentaram ligeira tendência para resultados mais resistentes (mudança de intermediário para resistente) no Vitek 2. Os resultados apontam para necessidade de reavaliação dos sistemas automatizados para betalactâmicos diante de *P. aeruginosa*, para minimizar a possibilidade de erros graves.

Comparação entre Phoenix e Vitek 2 na identificação de Gram-positivos e Gram-negativos

Dados da literatura apontam para similaridade entre os dois sistemas (Phoenix e Vitek 2), visto que não foram observadas diferenças significativas entre eles, seja no gênero ou espécie entre os Gram-positivos. Para Gram-negativos, o

Vitek 2 alcançou taxas de identificação superiores para fermentadores e não fermentadores – 99,6% versus 95,9%.

Na avaliação geral dos dados obtidos, as análises revelaram que as taxas de precisão de ambos os instrumentos variaram muito, dependendo do tipo de método de referência adotado para a identificação. Quando os resultados foram comparados com métodos convencionais, a automação mostrou melhores resultados, o que diferenciou de métodos moleculares.

Avaliação do desempenho dos sistemas automatizados para teste de sensibilidade para *S. pneumoniae*

Os resultados dos estudos comparativos a respeito da confiabilidade do antibiograma para *S. pneumoniae* liberados pelos sistemas automatizados utilizados no laboratório de microbiologia mostram elevada concordância entre os aparelhos, embora tenha sido observada menor taxa de erros considerados graves pelo Phoenix quando comparado com o Vitek 2. Avaliando de forma geral, os sistemas forneceram resultados confiáveis para *S. pneumoniae* diante de antibióticos e em menor tempo que os métodos manuais, tornando-os mais adequados para as demandas do ambiente clínico.

Deteção de resistência a imipeném em *Acinetobacter baumannii* pelos sistemas Phoenix, WalkAway e Vitek 2

Apesar do reconhecimento da boa acurácia entre os sistemas automatizados para alguns micro-organismos, especialmente aqueles que não são isolados frequentemente na rotina, em geral os não fermentadores, os sistemas apresentam falhas tanto na identificação quanto no antibiograma e, em alguns casos, gerando erros graves. Dados descritos na literatura, que avaliam resultados para *Acinetobacter baumannii* liberados por diversas metodologias, entre elas sistemas automatizados, Etest e microdiluição, apontam para melhores resultados para identificação com linha MicroScan, comparado a Vitek 2 e Phoenix. Quando foram avaliados os resultados do teste de sensibilidade para imipeném, observou-se que a microdiluição detectou 78% dos isolados resistentes, enquanto as demais metodologias (Etest®, Vitek 2 e Phoenix) apresentaram desempenho aceitável, com erros variando de 0,3 a 7,2%. Entre as metodologias testadas, o MicroScan mostrou pior desempenho, com taxa de 25% de erros graves e 44,6% de erros menores.

Esses resultados sugerem que os laboratórios clínicos que utilizam o sistema MicroScan devem considerar o uso de uma segunda metodologia para liberação de teste de sensibilidade para imipeném frente a *Ac. baumannii*.

Comparação entre os sistemas automatizados para detecção e inferência de mecanismos de resistência das enterobactérias diante dos carbapenêmicos

O grande desafio entre os sistemas automatizados é a capacidade de inferir mecanismos de resistência entre os micro-organismos, na liberação do antibiograma. Dados publicados sobre a detecção de carbapenemases entre as enterobactérias apontam para percentuais de sensibilidade e especificidade diferentes entre os sistemas avaliados: Phoenix 100%/0, Vitek 2 74%/38% e MicroScan 85%/19%, respectivamente. Quando se trata de amostras produtoras de Oxa-48, todos os sistemas não detectaram, embora KPC e metalcarbapenemases tenham sido detectadas com segurança.

A falha apontada em todos os sistemas consistiu na incapacidade de diferenciar a resistência a carbapenêmicos por produção de carbapenemases da resistência dependente da combinação de perda de porinas associada à produção de ESBL ou AmpC; nestes casos, os isolados são marcados incorretamente, dando uma especificidade de 0 em dois sistemas, sendo que o Vitek 2 conseguiu diferenciar melhor as duas situações, mostrando especificidade de 38%, entretanto, essa vantagem foi acompanhada de reduzida sensibilidade (74%). A dificuldade dos sistemas em reconhecer a produção de Oxa-48 pode ocorrer pela presença de sobreposição considerável nas CIM para isolados com esses mecanismos de resistência.

Essas deficiências podem ser superadas para sistemas com regras personalizáveis: se o laboratório adicionar uma nova regra em relação aos micro-organismos que mostram aumento de CIM de carbapenens, mas permanecem suscetíveis a cefalosporinas, ou, alternativamente, pode realizar teste de sinergia com todos os isolados encontrados não suscetíveis a um ou mais carbapenens.

No entanto, os estudos apontam que existem dificuldades com testes com carbapenêmicos e que os laboratórios devem considerar o uso de uma segunda metodologia para determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos frente aos carbapenêmicos.

Evolução do VITEK 2, MicroScan e Phoenix para identificação de isolados clínicos e cepas de referência

Avaliando a precisão dos três sistemas automatizados na identificação de micro-organismos (Vitek 2, MicroScan e Phoenix), em amostras clínicas e cepas de referência, foi observado um percentual de acerto em nível de espécie de 93,7, 82,4 e 93%, respectivamente, entre os isolados clínicos. Entre as cepas de referência, o índice de acerto diminuiu, ficando em 55,3, 54,4 e 78% entre os três sistemas.

O estudo mostra que a taxa de identificação em nível de espécie entre os sistemas foi elevada ou aceitável em isolados clínicos, embora o Phoenix tenha apresentado desempenho significativamente superior ao Vitek 2 ou MicroScan na identificação das cepas de referência. A identificação com menor precisão das cepas de referência entre os três sistemas pode ser explicada pelas características dos tipos das cepas testadas, que apresentam maior dificuldade de identificação.

Comparação entre os sistemas automatizados Phoenix e Vitek 2 para detecção de resistência para macrolídeos-lincosamida-estreptogramina entre isolados clínicos de *Staphylococcus* spp

Dois sistemas automatizados, Phoenix e Vitek 2, foram comparados com um método de difusão de disco duplo para a detecção de resistência induzível à clindamicina em *Staphylococcus* spp. Análise de 524 isolados clínicos revelou sensibilidade e especificidade de 100 e 99,6%, respectivamente, para o Phoenix, e 91,1 e 99,8%, respectivamente, para Vitek 2.

Avaliação dos sistemas na detecção de resistência de *Staphylococcus* spp à vancomicina

O relato de resistência à vancomicina em *Staphylococcus* spp tem preocupantes consequências terapêuticas e epidemiológicas. Durante os últimos anos, uma série de isolados de *Staphylococcus* spp que demonstram suscetibilidade reduzida à vancomicina (ou a outros glicopeptídeos) ou à linezolida foram relatados, e vários trabalhos abordaram as habilidades dos sistemas automatizados em detectar tais resistências.

Diversos dados têm sido publicados com estudos comparativos entre sistemas automatizados, na detecção de resistência à vancomicina para *Staphylococcus* spp e apontam para discrepâncias entre os resultados liberados, em que isolados de *S. aureus* com CIM de vancomicina de 2 a 8 µg/mL foram detectados por Phoenix e Etest, mas não por MicroScan, Vitek 2 ou Sensititre. Outros mostraram que a triagem de isolados MRSA por meio do uso de métodos modificados baseados em Etest detectou fenótipos potenciais de *S. aureus* com resistência intermediária heterogênea a glicopeptídeos (hGISA) para 9% (8/92) dos isolados. Quase todos os isolados com fenótipo hGISA tiveram alta CIM, conforme determinado por Etest, MicroScan e Vitek 2. Em contraste, quando realizada a microdiluição em caldo, CIM alta foi observada apenas em 50% dos isolados.

Um estudo publicado na literatura científica comparou os resultados obtidos por seis sistemas comerciais que usam teste de CIM (Etest®, MicroScan, Phoenix, Sensititre, Vitek 2 Legacy e Vitek 2) e por três métodos de referência (diluição em ágar, disco difusão e triagem com ágar com vancomicina) com os resultados obtidos pelo método de referência estabelecido pela CLSI (microdiluição em caldo) para a detecção de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA). Os resultados por este estudo mostraram uma concordância entre os sistemas variando de 98 a 100% para todos os métodos, exceto para o sistema Vitek 2 Legacy, para o qual foi de 90,6%. Entre os seis sistemas comerciais testados para determinação de CIM, Sensititre, Vitek 2 Legacy, e Vitek 2 tenderam a categorizar isolados VISA como suscetíveis; MicroScan, Phoenix e Etest tenderam a categorizar cepas suscetíveis como VISA; e Vitek 2 Legacy categorizou cepas VISA como resistentes.

MICROBIOLOGIA TOTALMENTE AUTOMATIZADA

A engenharia clínica tem avançado para que no futuro haja uma microbiologia com total automação. Hoje estão disponíveis no mercado três tipos de sistema para a microbiologia totalmente automatizada: Kiestra (BD Kiestra BV), FMLA (bioMérieux, Inc.) e o WASPLab (Copan Diagnostics).

As três marcas são compostas por um sistema de inoculação, transporte/esteira para as placas até a incubadora inteligente (com ou sem CO₂), onde câmaras digitais capturam imagens em intervalos determinados, disponíveis em telas para avaliação do microbiologista, cujas imagens são mantidas para revisão, caso necessário. Na tela, o microbiologista pode selecionar amostras que vão ser identificadas pelo sistema MALDI-TOF e outro sistema automatizado para realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais razões que levam à implantação de automação na prática da microbiologia são: possibilidade de padronização de métodos de identificação e teste de suscetibilidade, liberação de resultados com melhor acurácia e rapidez, diminuição de mão de obra e capacidade de identificação em nível de gênero e espécie da maioria dos micro-organismos clinicamente revelantes. Todas essas características têm impactado no conhecimento dos dados epidemiológicos nos diferentes serviços de saúde, bem como no reconhecimento do perfil de suscetibilidade dos micro-organismos envolvidos nas diversas infecções que acometem os pacientes nas unidades de internamento, além de ter grande

importância na padronização da política dos antimicrobianos e no controle de infecções relacionadas aos cuidados de saúde.

Embora seja considerada imprescindível a implantação dos sistemas automatizados no laboratório de microbiologia, alguns obstáculos são reconhecidos e descritos como impedimentos desses sistemas, o que pode explicar a falta de adesão por grande parte dos laboratórios clínicos. Entre as diversas razões, destacam-se a complexidade da microbiologia, a resistência por parte do profissional em substituir parte do seu serviço pelo aparelho, impossibilidade de automação completa, como ocorre em outros setores (p.ex., hematologia e bioquímica), limitação na escolha de testes e antibióticos a serem testados e padronizados por cada serviço, além do fator de maior impacto, o alto custo por teste.

O uso dos sistemas no processamento de amostras microbiológicas enfrenta a impossibilidade de padronização total, pois, diferentemente de setores que utilizam amostras com menor diversidade, como hematologia e imunologia, a microbiologia trabalha com amostras oriundas de sítios diferentes, gerando diversidade nos tipos de materiais processados, que oscilam entre sangue, tecidos, secreções, cateteres, que são processados em diferentes formas (centrifugação, maceração) e transportados em diferentes dispositivos.

Apesar do avanço dos sistemas automatizados, vários estudos relatam discrepâncias nos resultados liberados quando comparados com métodos alternativos, especialmente no teste de suscetibilidade, em que podem ser liberados apresentando falsa resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos, frente a diferentes bactérias. Tais resultados podem ser associados à degradação do antimicrobiano ou ao inóculo realizado.

Diante de todas as observações acerca dos sistemas automatizados, é imprescindível a presença de profissionais qualificados na equipe de microbiologia, além da manutenção de testes fenotípicos para identificação e metodologia opcional para a realização do antibiograma, objetivando a confirmação das discrepâncias que podem ocorrer nos resultados liberados pelos sistemas automatizados.

BIBLIOGRAFIA

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. Acessado em: 20 abr 2014.
2. Annane D et al. Septic shock. *The Lancet* 2005;365:63-78.
3. BD Bactec Instrumented Blood Culture Systems. <http://www.bd.com/ds/productCenter/BC-Bactec.asp>. Acessado em: 19 abr 2014.

4. BD Directigem Meningitis Combo Test Kit. <http://www.bd.com/scripts/brasil/productsdrill-down.asp?CatID=115&SubID=308&siteID=10056&d=brasil&s=brasil&sTitle=&metaTitle=Microbiologia&dc=brasil&dcTitle=BD+-+Brasil>. Acessado em: 29 abr 2014.
5. BD Phoenix Automated Microbiology System. <https://www.bd.com/ds/productCenter/IS-Phoenix.asp>. Acessado em: 19 abr 2014.
6. BacT/ALERT® 3D para produtos Farmacêuticos, Cosméticos e de Biotecnologia. http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?open=BRZ_IND_BPA_PRD&doc=BRZ_IND_BPA_PRD_G_PRD_NDY_12&pubparams.sform=1&lang=pt_br. Acessado em: 18 abr 2014.
7. Bourbeau PP, Ledebner NA. Automation in clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1658.
8. Buchana B, Anderson NW, Ledebner NA. Comparison of Phoenix and bioMérieux Vitek 2 automated systems for the detection of macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance among clinical isolates of *Staphylococcus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;72(3):291-4.
9. Burnham CD et al. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clin Chem* 2013;59(12):1696-702.
10. Cantón E et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5590-6.
11. Carbonelle E et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 2010;44:104-9.
12. Charles ES, Davis JR. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 1992;5(3):302-27.
13. Chatzigeorgiou KS, Sergentanis TN, Tsiodras S, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the Identification of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: a Comprehensive Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* 2011;49(9):3284-91.
14. Fuller DD et al. Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic Medium for Recovery of Mycobacteria, Fungi, and Bacteria from Blood. *J Clin Microbiol* 2001;39(8):2933-6.
15. Gherardi G. Comparative evaluation of the Vitek 2-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;72(1):20-31.
16. Greub G, Prod'Hom G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2011;17(5).
17. Jina W et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:442-7.
18. Klaerner HG et al. Failure of an automated blood culture system to detect nonfermentative Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1036-41.
19. Kocoglu ME, Bayram A, Balci I. Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system. *J Microbiol* 2005;43(3):257-9.

20. Kulah C et al. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway BMC Infectious Diseases, 2009.
21. Majors ML, Robinson A. Evaluation of the Phoenix™ YEAST ID for the automated identification of yeast isolates, abstr P-1221. Abstr 112th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology. Washington, DC. 2012.
22. Mittman SA et al. Comparison of Phoenix to Vitek 2, MicroScan MICroSTREP, and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 2009;47(11).
23. Mittman SA. Comparison of Phoenix to Vitek 2, MicroScan MICroSTREP, and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 2009;47(11):3557-61.
24. Morgan M et al. Comparative evaluation of the Phoenix YEAST ID panel and the Vitek 22 colorimetric yeast identification card for identification of yeast isolated from clinical samples, abstr P-1220. Abstr 112th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC., 2012.
25. Posteraro B et al. Comparative Evaluation of Phoenix and Vitek 2 Systems for Species Identification of Common and Uncommon Pathogenic Yeasts. J Clin Microbiol 2013;51(11):3841-5.
26. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Accuracy of three automated systems (MicroScan WalkAway, VITEK 2, and VITEK 2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. J Clin Microbiol 2006;44(3).
27. Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct Comparison of the Phoenix System with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and nonfermentative Gram-negative organisms. J Clin Microbiol 2008;46(7):2327-33.
28. Soloaga R et al. Sistema automatizado de Hemocultivos Bact-alert: 5 vs 7 dias de incubation. Primer estudio multicéntrico argentino. Rev Argent Microbiol 2004;9(36):24-7.
29. Spaargaren J, Van Boven CPA, Voorn GP. Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in Bactec Plus Aerobic/F Culture Medium. J Clin Microbiol 1998;36(12):3731-3.
30. VITEK® 2 – Automated instrument for ID/AST testing. <http://www.biomerieux-diagnostics.com/Vitek-2-2>. Acessado em: 19 abr 2014.
31. Winstanley T, Courvalin P. Expert systems in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):515-56.
32. Woodford N et al. Comparison of Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2010;48(8):2999-3002.

11. Verificação e validação de procedimentos no laboratório de microbiologia clínica

INTRODUÇÃO

Uma das mais importantes atribuições dos testes laboratoriais é a relação em produzir acurácia, precisão e reprodutibilidade em tempo hábil com relevância clínica. Existem diversos fatores que podem ser avaliados para determinar a proficiência desses testes e dos profissionais envolvidos.

Quando se introduz um novo teste, método ou equipamento no laboratório, deve-se avaliar o desempenho desse novo procedimento. Os dois maiores fatores de desempenho que se podem avaliar são verificação e validação.

Verificação é o processo que determina ou confirma o desempenho esperado do teste antes da implementação na rotina clínica; validação é o processo de monitoração desse teste, procedimento ou método, que garante a continuidade do desempenho esperado. A validação é alcançada por meio de controle interno da qualidade, testes de proficiência, competência técnica e calibração dos equipamentos.

TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos no laboratório de microbiologia é um dos resultados que mais afetam a escolha da terapia no tratamento dos pacientes. Assim, é extremamente importante que os microbiologistas tenham confiança durante a escolha, na acurácia e nos resultados obtidos na realização dos métodos de teste de sensibilidade. Um grande número de protocolos e recomendações para a verificação de teste de sensibilidade já foi discutido na literatura. Apesar de trazer alguma dificuldade em realizar um teste mais rigoroso para essas avaliações, as cepas controle (p.ex., cepas

ATCC – *American Type Culture Collection* – ou de outras fontes confiáveis) e as cepas oriundas de isolados clínicos podem ser utilizadas para a verificação de acurácia e reprodutibilidade dos testes ou sistemas automatizados. Isolados oriundos de ensaios de proficiência também podem ser usados na verificação.

A avaliação dos testes de sensibilidade deve seguir o mesmo critério de distribuição dos isolados comumente encontrados e que apresentem fenótipos de resistência semelhantes aos encontrados em sua instituição. Devem estar incluídos na avaliação do painel para Gram-positivos isolados de *Staphylococcus aureus* MRSA (resistentes à oxacilina), cepas de *Staphylococcus aureus* que tenham resistência induzida aos MLS (macrolídeos, lincosamidas e streptograminas – D-teste positivo), *Staphylococcus coagulase* negativo e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Para a verificação de painéis em Gram-negativos, devem estar incluídos isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL), carbapenemases e AmpC, juntamente com cepas multirresistentes.

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter* sp devem ser incluídos se forem isolados normalmente na instituição. Algum outro isolado multirresistente que tenha alta prevalência na instituição também deve ser testado.

No total, um mínimo de 30 isolados deve ser testado diante de cada antibiótico, painel ou cartão. Para se obter um resultado mais próximo da realidade da instituição, deve haver um esforço para que os isolados encontrados na rotina façam parte da avaliação.

Para que seja avaliada a reprodutibilidade do teste, é necessário que cinco isolados sejam testados em triplicata por 3 a 5 dias seguidos. Isolados com fenótipos de resistência ou cepas padrão (ATCC) podem ser usados nessa avaliação. É preferível que, entre esses isolados, pelo menos dois tenham fenótipos de resistência (p.ex., MRSA e *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenéns).

Resultados de precisão aceitáveis são aqueles que demonstram no mínimo um valor de concordância maior ou igual a 95% em relação ao método de referência comparado.

Precisão (reprodutibilidade) por concordância essencial (PCE)

Concordância entre ± 1 diluição no teste de determinação de MIC por isolado.

$$\text{PCE} = \frac{\text{Número de comparações entre } \pm 1 \text{ diluição de MIC conhecida}}{\text{Número total de resultados}} \times 100$$

Obs: o total de testes pode ser calculado para todos os micro-organismos e drogas combinadas ou para cada droga separadamente.

Precisão (reprodutibilidade) por concordância de categoria (PCC)

Concordância por interpretação dos resultados (sensível/intermediário/resistente – SIR) de precisão por isolado utilizando o critério de interpretação do CLSI/FDA.

$$\text{PCC} = \frac{\text{Número de resultados por categoria encontrados}}{\text{Número total de resultados}} \times 100$$

Obs: o total de testes pode ser calculado para todos os micro-organismos e drogas combinadas ou para cada droga separadamente.

Estudos de verificação não comparados com métodos de referência (≥ 30 isolados por painel/cartão)

Algumas avaliações podem não ser feitas em comparação a algum método de referência em função da limitação de custo ou operacional. Essas avaliações são comparadas somente aos métodos já utilizados e implantados na rotina diária do laboratório. Por essa razão, os testes de ambas as metodologias não podem ser discrepantes. Não é possível eleger a metodologia vigente como correta quando houver discrepância de resultados com a metodologia comparada. Para esse tipo de avaliação, quando não há comparação com algum método de referência, a avaliação das discrepâncias tem de ser obtida por “taxas de erro”.

Uma discrepância menor (*minor error* – MINE) é definida quando um resultado do teste de sensibilidade é de resistência intermediária e o de outro é de sensível ou resistente. Uma discrepância maior (*very major error* – VME) é definida quando um resultado é sensível e outro resistente. Para esse tipo de avaliação, não deve haver discrepância maior (VME).

E no total da avaliação, o mínimo de discrepâncias maiores (*major error* – ME) tem de ser menor que 5% e tanto a concordância essencial (PCE) como a concordância por categoria (PCC) precisam ser maiores que 90%.

Major error (ME)

Uma metodologia de teste de sensibilidade avaliada indica um resultado do teste como sensível ou resistente, e a outra metodologia demonstra o oposto, resistente ou sensível.

$$ME = \frac{\text{Número de discrepâncias maiores (ME)}}{\text{Número total de resultados resistentes por ambos os métodos}} \times 100$$

Minor error (MINE)

Uma metodologia de teste de sensibilidade avaliada indica um resultado como intermediário e a outra metodologia demonstra como sensível ou resistente.

$$MINE = \frac{\text{Número de discrepâncias menores (MINE)}}{\text{Número total de micro-organismos testados}} \times 100$$

Obs: o total de testes pode ser calculado para todos os micro-organismos e drogas combinadas ou para cada droga separadamente.

Estudos de verificação comparados a métodos de referência (> 100 isolados por painel/cartão)

Em laboratórios de grande porte, de maior rendimento e que tenham alta prevalência de isolados com fenótipos de resistência, é preferível que se produza um estudo em larga escala com um total de 100 amostras ou mais por metodologia, painel ou cartão.

No mínimo 50% dos isolados nessa avaliação precisam ter algum fenótipo de resistência. Discrepâncias entre a metodologia de teste de sensibilidade avaliada devem obrigatoriamente ser comprovadas contra alguma metodologia de referência (p.ex., microdiluição em caldo, macrodiluição em caldo ou diluição em ágar). É aceitável verificar uma nova metodologia de teste de sensibilidade somente contra um teste de referência com determinação de MIC.

Podem-se aplicar as mesmas avaliações de taxas de erros citados anteriormente. Os valores para concordância essencial (CE) e concordância por categoria (CC) devem ser $\geq 90\%$, enquanto o desempenho para os VME deve ser $\leq 3\%$. Não mais do que 1 em 33 desses isolados reportados como resistentes poderá repetidamente mostrar falsa sensibilidade. Os ME também não devem ser $\leq 3\%$. Para os ME e MINE combinados e testados em pelo menos 100 isolados, o percentual deve ser $\leq 7\%$.

PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Verificação de sistemas automatizados ou manuais para identificação bacteriana em nível de espécie precisa ser conduzida com um mínimo de 20 isolados representativos e clinicamente relevantes encontrados na instituição. Devem ser incluídos na avaliação dos Gram-positivos isolados como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus* sp e *Streptococcus pneumoniae*. No caso dos Gram-negativos, os seguintes isolados devem ser testados: membros de *Enterobacteriaceae* e não fermentadores de glicose. Nas instituições em que existe maior complexidade de pacientes, com ampla variedade de micro-organismos clinicamente relevantes, é aconselhável que a avaliação seja feita com mais que 20 isolados. Em adição, micro-organismos de controle de qualidade devem ser testados e incluídos na avaliação.

Nos testes de identificação microbiana, é preciso ter, no mínimo, uma concordância de 90% contra o sistema existente ou o método de referência antes de o método ser considerado como aprovado. Em função de vários fatores, o nível de identificação errônea aceitável pode ser determinado por cada laboratório e devem ser levadas em conta a limitação de desempenho de cada fabricante e as especificações encontradas nas instruções de uso.

Certos grupos de micro-organismos tendem a ser mais desafiadores na avaliação de novos sistemas de identificação (p.ex., não fermentadores de glicose, corinebactéria, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Streptococcus* grupo *viridans*) e uma grande flexibilidade pode ser necessária para determinar a acurácia nesses grupos (p.ex., identificação somente do gênero).

De qualquer modo, todo tipo de identificação incorreta deve ser analisada. Os testes que não identificarem os micro-organismos podem necessitar de provas complementares ou até mesmo não chegar a nenhuma identificação. A identificação incorreta dos micro-organismos é um dos erros mais graves em qualquer sistema de identificação. Apesar disso, o laboratório pode optar por aceitar uma identificação parcial por diversos fatores (p.ex., custo ou tempo) sem precisar lidar com a inconveniência de testes adicionais ou admitir que a identificação tenha menor impacto clínico.

Se a acurácia do novo teste não foi satisfatória e não preencheu os requisitos para a verificação, o teste é considerado não aprovado e deve ser retirado para considerações ou ações corretivas pelo usuário, fabricante ou ambos. Após a ação corretiva, o novo ou revisado teste deve ser avaliado novamente em paralelo com algum método de referência e interpretado como descrito anteriormente.

SISTEMAS DE HEMOCULTURAS

Uma verificação significativa de um novo sistema de hemocultura é um dos maiores desafios para um microbiologista clínico. Testes paralelos requerem coletas de sangue adicional de cada paciente e, geralmente, isso não é possível para alguns pacientes e instituições. O baixo índice de positividade de patógenos clinicamente relevantes (entre 8 e 14%) faz com que a maioria das amostras coletadas tenha um pequeno valor na comparação. Além disso, a incidência de contaminação (1 a 3%) e a predominância de um número limitado de patógenos faz com que a avaliação fique direcionada apenas somente a alguns patógenos clinicamente relevantes. Assim, o desenho da avaliação deve ser direcionado de modo a responder a algumas perguntas:

- O meio de cultura utilizado no sistema avaliado é capaz de suportar o crescimento de micro-organismos (que devem incluir: leveduras, fungos filamentosos, anaeróbios e micro-organismos fastidiosos) comumente encontrados na população de pacientes do usuário?
- O instrumento (no caso de equipamentos automatizados) detecta em tempo hábil a maioria dos micro-organismos patogênicos contidos nessas hemoculturas?

Duas abordagens para a verificação de sistemas de hemocultura serão discutidas adiante. Os laboratórios devem escolher a que melhor se adapte ou a que seja mais viável em termos de custos e vantagens operacionais. Pode haver circunstâncias em que o laboratório tenha de implementar uma nova versão de um sistema de teste. Sistema de hemocultura automatizada é um bom exemplo disso. Dependendo das mudanças na nova versão do sistema, um novo estudo de verificação não é necessário. Se as diferenças entre a versão atual e a nova versão estiverem limitadas ao instrumento de hemocultura (p.ex., *hardware* ou *software*) e não havendo mudança no frasco, é necessária apenas uma verificação por parte do fabricante do funcionamento completo do equipamento de hemocultura. Essa verificação será realizada para checar o tempo de incubação, temperatura, sistemas óticos e *software* nas especificações do fabricante.

Estudo de hemocultura semeada

Selecionar um mínimo de 20 isolados representativos de hemoculturas normalmente encontrados na instituição. Incluir Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras. Para aumentar a abrangência do teste, incluir tanto isolados recentes

como os em estoque. Para o desafio do sistema, utilizar sangue humano estéril, livre de antibióticos, em quantidade recomendada pelo fabricante. Esse sangue deve ser inoculado em cada frasco de hemocultura. Em adição, o número de micro-organismos inoculados em cada frasco deve ser aproximadamente o mesmo encontrado nos casos de septicemia (que pode ser menos de 0,1 UFC/mL de sangue). Isso é conseguido ao se realizar diluições seriadas dos micro-organismos antes da inoculação, para alcançar aproximadamente 5 a 30 UFC/frasco.

O método é considerado verificado se todos os isolados forem detectados dentro dos tempos especificados pelo usuário. Os tempos de positividade devem ser condizentes com os da literatura para cada micro-organismo.

Cerca de 3 dias são suficientes para recuperar no mínimo 95% das bactérias e leveduras clinicamente relevantes. Qualquer problema de detecção deve ser investigado repetindo-se os testes com os mesmos isolados de pacientes. Se mesmo assim não houver detecção desse isolado, uma ação corretiva deve ser tomada pelo usuário e pelo fabricante antes da implantação do sistema.

Estudo de hemocultura pareada

O desempenho do estudo de hemoculturas pareadas avalia todos os aspectos do novo sistema sob as condições dos pacientes e do laboratório. Quando um laboratório decide pelo estudo de hemoculturas pareadas de um sistema comercial, amostras duplicadas de hemocultura devem ser inoculadas com o volume equivalente a, no mínimo, 20 amostras positivas (sem incluir os contaminantes) que representem os isolados mais representativos de hemocultura da instituição. O novo método é considerado validado se a sensibilidade for no mínimo 95% relativa ao método de referência, e se o tempo de detecção for insignificante entre os dois métodos. Se o novo método não apresentar desempenho satisfatório, ações corretivas devem ser tomadas antes da implantação do sistema automatizado de hemoculturas.

TESTE DE PROFICIÊNCIA NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

O teste de proficiência deve ser realizado pelo menos duas vezes ao ano. Além disso, o laboratório deve tratar a amostra de proficiência da mesma maneira que trata as amostras clínicas que dão entrada no laboratório. Por exemplo, se uma amostra de paciente que normalmente durante sua análise no laboratório não necessita de repetição do ensaio, a amostra de proficiência também deve seguir os mesmos critérios de análise e interpretação dos resultados. A incapacidade

de acertar no mínimo 80% dos eventos em uma determinada especialidade (p.ex., microbiologia, parasitologia, micobacteriologia ou virologia) indica um desempenho insatisfatório. O laboratório deve então retrainar toda a equipe com documentação pertinente ao ensaio ou área. Falha na avaliação geral para dois testes consecutivos ou dois testes errados de três consecutivos também indica desempenho insatisfatório. Para testes que não estejam disponíveis em programas de ensaios de proficiência externos, o laboratório tem de estabelecer um teste de proficiência interno para mensurar a acurácia e a segurança do teste.

BIBLIOGRAFIA

1. Garcia LS. Clinical microbiology procedures handbook. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2010.
2. Murray PR. Manual of clinical microbiology. v.1. 9.ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2007.
3. Sharp SE. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory – 31A Cumitech. Washington: American Society for Microbiology Press, 2009.

12. Treinamento e desenvolvimento

INTRODUÇÃO

O treinamento tem que estar ligado ao ciclo de vida da organização, de nada adianta efetuar todas as etapas do treinamento se este não está sincronizado com a fase que a empresa se encontra no seu ciclo de vida.

A vida de uma empresa é composta por períodos e estes por uma série de características a serem alcançadas ao compasso que surgem novas características capazes de suprir as anteriores, estas passam a ser obsoletas. Acompanhando esse processo pode-se afirmar que a empresa, ao alterar suas características, alcançando novas, está evoluindo no seu ciclo de vida. (Borinelli, 1998)

No século XX, a sociedade vivia a marcha da Revolução Industrial e, desde então, a humanidade tem assistido e protagonizado transformações importantes em um ritmo exponencial no conhecimento e desenvolvimento de novas tecnologias, e também nas relações interpessoais. Após a Revolução Industrial, o mundo passou por duas outras grandes revoluções mais silenciosas, que foram a Revolução da Produtividade e a Revolução da Administração. A produtividade começa a interessar como subproduto da industrialização e, em consequência, há um movimento do valor da terra para o valor do capital. Pessoas passaram a ser vistas como um recurso, um valor de capital, logo, surge a expressão “recursos humanos”. Frederick Winslow Taylor começou a aplicar o conhecimento sistemático na execução de tarefas nas fábricas, tendo como proposta principal aumentar a produtividade. Nessa época, gerou-se então um conflito entre industriais com marcado desejo de aumentar a produtividade e,

do outro lado, os trabalhadores, que reivindicavam menor jornada de trabalho e ganhos maiores. Havia, portanto, expectativas diferentes em ambos os lados do conflito. Estava em curso, dessa forma, a Revolução da Produtividade, que promoveu para Taylor o desafio de criar métodos mais eficientes de trabalho para atender a ambos os lados. Para isso, novas formas e métodos mais eficientes de trabalho foram desenvolvidos e aplicados, conhecidas como taylorismo. As ideias de Taylor foram o centro das discussões sobre o trabalho durante toda a metade do século XX. A Segunda Guerra Mundial trouxe uma importante influência sobre essa nova ciência, visto que, diferentemente da Primeira Guerra Mundial, que era uma guerra de trincheiras, a Segunda Guerra Mundial foi uma guerra na qual a otimização de recursos, logística e treinamento de pessoas foram determinantes. As noções administrativas desenvolvidas na ocasião continuaram sendo aplicadas na reconstrução dos países e na reorganização da sociedade, entre eles o Japão, que em 20 anos se reabilitou como potência mundial, agora econômica e tecnológica, e não há dúvidas de que a aplicação dos princípios da administração teve parte nisso.

O final do século XX traz a Revolução do Conhecimento, de modo que novas exigências pessoais e profissionais se fizeram necessárias. Nos dias de hoje, vê-se menos produtividade e mais competitividade, menos informação e mais conhecimento, menos treinamento e mais educação. A Unesco referendou as características do trabalhador do século XXI, que podem ser resumidas em poucas palavras, o que nos provoca a uma reflexão sobre elas: flexibilidade, criatividade, informação, comunicação, responsabilidade, empreendedorismo, sociabilização e tecnologia. O mercado quer, portanto, elencando duas dessas características, pessoas criativas e flexíveis, mais do que especialistas superinformados. Conclui-se, pois, que o diploma da faculdade, da especialização do mercado ou do MBA continua sendo importante, mas não é mais a peça-chave que abre todas as portas. O mercado valoriza, hoje, pessoas capazes de agir de forma mais abrangente, donas de qualidades humanas tão bem cuidadas quanto as qualidades acadêmicas e profissionais. Conhecimento é importante, mas é apenas uma das partes que compõem a competência. Aquela forma simples de dizer que as competências estão representadas pela sigla CHA (conhecimento, habilidade e atitude) foi recentemente acrescida de “VE”, ou seja, valor entregue. O velho chavão que dizia que “quem não tem competência não se estabelece” pode ser substituído por “quem não tem competência não compete”. A competência é a capacidade de “resolver problemas e atingir objetivos propostos”. A competência é diretamente proporcional ao resultado obtido, mas é

inversamente proporcional ao tempo consumido para atingi-lo e aos recursos ou esforços utilizados.

A atividade profissional passa, no momento, por uma situação semelhante na dicotomia emprego/trabalho, uma novidade do século XXI que nos leva a optar entre segurança e liberdade. Antigamente, um jovem em idade de prestar o vestibular tinha três opções: medicina, engenharia ou direito, ou poderia submeter-se a algum concurso público no qual iria trabalhar até se aposentar. A vida era linear. Hoje, tudo está mudado e convive-se, na atualidade, com a incerteza.

A principal vantagem competitiva atualmente é o conhecimento. Vive-se na Era do Conhecimento ou sociedade do conhecimento. No entanto, conhecimento não é sinônimo de competência, mas é o componente inicial e que exige reposição contínua em função da velocidade do mundo atual. Um novo grupo de trabalhador está surgindo, o chamado “trabalhador do conhecimento”, uma expressão criada por Peter Drucker. Esse profissional não é mais aquele que tem o conhecimento como produto, mas que observa atônito suas atividades serem bombardeadas diariamente com novidades, especialmente as tecnológicas. O conhecimento, que até o início do Cristianismo havia duplicado, dobrou nos últimos 200 anos, novamente dobrou nos últimos 50 anos e agora dobra a cada 10 anos. Na penúltima década do século passado, o conhecimento foi multiplicado por 4 e na última década, por 10. Estudar deixou de ser uma atividade típica do estudante no sentido clássico da palavra. Estudar passou a ser uma atividade continuada. Na atualidade, jovens recém-formados dizem que estudam mais agora do que estudavam na época em que eram universitários. Ter informação não é uma vantagem competitiva, mas, sim, ter conhecimento. O conhecimento é uma informação com significado, capaz de mudar, criar e transformar. No entanto, como explicou o suíço Jean Piaget, não se pode transferir conhecimento, mas pode-se construí-lo.

Há dois tipos distintos de conhecimento: o conhecimento explícito e o conhecimento tácito. O primeiro é aquele que pode ser transformado em um instrumento de leitura, como um livro, uma apostila, uma página na internet ou intranet empresarial. Normas, procedimentos, condutas, rotinas, fórmulas, receitas, nomenclaturas e gráficos são exemplos de conhecimento explícito. A internet é um instrumento que proporcionou a divulgação abrangente do conhecimento explícito. Já o conhecimento tácito, cujo sentido derivou da palavra latina *tacitu*, que significa silencioso, calado, que não emite ruído e, portanto, não provoca rumor. Ele é construído pelo profissional ao longo dos anos e advém da intuição própria e da experiência, da sensibilidade. Esses profissionais construíram esse

conhecimento ao longo de suas carreiras e não sabem como compartilhá-lo, pois não o receberam por meio de palavras. Qualquer profissional de uma empresa adquiriu um conhecimento que é seu e foi construído por conta própria. Esse conhecimento só pode ser compartilhado pelas relações humanas. Uma receita de bolo, por exemplo, pode ser seguida de forma correta pela descrição, mas nem sempre o resultado é o desejável ou é o mesmo da pessoa que transmitiu essa informação e que o faz de forma inconfundível. Faltam informações que não podem ser colocadas no papel, como o ponto da massa, o sabor da mistura dos temperos, etc., ou seja, falta o conhecimento daquela pessoa que adquiriu a maneira de “como fazer” a receita. Por essa razão é que dispensar profissionais com grande conhecimento tácito das empresas após seus 35 anos de trabalho é como queimar uma biblioteca.

Assumindo, pois, que o conhecimento pode ser construído, deve-se ser sempre, como dizia Gonzaguinha em sua canção, “um eterno aprendiz”. Hoje já se fala no chamado quarto grau e que equivale, portanto, à continuação do ensino formal e prolonga-se por toda vida e que se denomina educação continuada. Um dos muitos livros de provocações filosóficas de Mário Sérgio Cortella, filósofo brasileiro, tem um título que é mais que uma provocação, é uma afirmação: *Não nascemos prontos*. O título é uma especial e feliz afirmação que nos provoca a pensar que se não nascemos prontos, estamos nos construindo a cada dia. Logo, por que não investir na construção do conhecimento e, através dele, produzir as transformações no mundo que queremos ter?

GESTÃO DO CONHECIMENTO E RELACIONAMENTO

Há uma frase de Samuel Lima, autor do livro *Gestão do conhecimento e relacionamento*, que diz: “Sempre alimentei grandes sonhos. Sonho de ser feliz, de construir essa felicidade com as coisas mais simples da vida, como conviver com pessoas, desenvolver uma boa receita na cozinha, inventar molhos, visitar amigos (de verdade), ajudar os mais necessitados e tantas atitudes e simples atitudes que tornam o ato de viver a maior das dádivas”, e, como pode-se ver na Introdução, o relacionamento é um fator importante para a transferência do conhecimento tácito.

É, na verdade, uma grande provocação filosófica do autor, que nos leva a considerar que, como dizia o professor e político Enéas: “as coisas complexas são aglomerados de coisas simples”. Ele estava certo. Às vezes nos deparamos, como líderes e gestores de nossas empresas, com desafios que nos parecem im-

possíveis de serem transpassados. No entanto, com calma, inteligência emocional, determinação e muito trabalho, vamos resolvendo os problemas e, ao final, concluímos que foi mais simples do que inicialmente parecia.

Peter Druker antecipou nos anos 1970 que cada vez mais os ganhos de produtividade não adviriam das máquinas, mas, sim, da melhoria do capital humano. Pessoas com conhecimento e paixão, ingrediente importante nos líderes e gestores empresariais, são o bem maior que as empresas podem ter. Dessa maneira, aplicar recursos no desenvolvimento desse capital intelectual e nas qualificações e habilidades de um profissional na empresa é mais que um gasto, é realmente um investimento. Daí a necessidade de aplicar de forma sistemática a educação continuada nas empresas como modo de ampliar o conhecimento e promover o crescimento empresarial. Todavia, o conhecimento não terá valor para a empresa se não for adequadamente administrado, assim, exige-se que se criem processos de armazenagem, disseminação e gestão do conhecimento para que este não se perca dentro da organização. Às vezes, permite-se que aconteça o pior, esse conhecimento vai para fora da organização e passa a fazer parte do capital competitivo de outra organização, fragilizando, assim, a competitividade da empresa. No entanto, é preciso estar atentos para o fato de que o conhecimento só traz valor para as empresas se houver gestão. Na retenção de talentos, não se deve deixar a porta aberta. Reter talentos é um desafio para qualquer gestor de RH.

Como se perde e como se retém o conhecimento na empresa? É uma questão difícil de ser contextualizada porque envolve uma série de fatores que vão desde a forma de seleção dos profissionais da empresa até as políticas de salários (plano de cargos e salários), benefícios, recursos, bônus, participação de lucros, avaliação de desempenho, além dos aspectos motivacionais, cujas teorias são muitas vezes complexas e difíceis de serem aplicadas na empresa com os resultados que desejamos no tempo em que desejamos. Esses fatores estão atrelados à cultura organizacional da empresa, que também é um aspecto difícil de ser definido. O que é cultura organizacional? A resposta talvez passe pela resposta dada por um juiz americano, citada no livro “Comportamento Organizacional”, quando lhe perguntaram como ele definiria pornografia: “Não consigo definir o que é, mas a reconheço quando a vejo”. Assim, pode-se dizer que “cultura organizacional é um sistema de valores compartilhado pelos membros de uma organização que a diferencia das demais”. Criar uma cultura organizacional exige tempo e requer atenção ao patrimônio intangível das empresas: os profissionais. Existem sete características básicas que capturam a essência da cultura de uma organização:

- Inovação: estímulo à inovação e capacidade de assumir riscos.
- Atenção aos detalhes: grau de precisão e atenção aos detalhes que se espera do colaborador.
- Orientação para os resultados: dirigentes focados nos resultados mais do que nas técnicas e nos processos empregados para o seu alcance.
- Foco na pessoa: as decisões devem levar em consideração o efeito dos resultados sobre as pessoas dentro da organização.
- Foco na equipe: organização das atividades de trabalho em torno das equipes em vez dos indivíduos.
- Agressividade: manter as equipes competitivas e agressivas.
- Estabilidade: as atividades organizacionais não devem focar o *status quo*, e sim o crescimento, a melhoria contínua.

No entanto, esses resultados, exigem mudança de cultura na empresa e, como cita Howard Gardner, professor de Harvard, tem-se muita dificuldade para mudar. Mudar uma cultura pode levar anos. Exige uma construção nova que envolve pessoas, tempo, determinação, avaliação frequente dos resultados e, quando necessário, ações corretivas naquele processo.

Uma boa definição para a gestão do conhecimento é aquela que diz que é “o desenvolvimento de processos e de sistemas para a aquisição, administração e compartilhamento de ativos intelectuais – dentro da empresa ou com parceiros de negócio –, com a finalidade de gerar riqueza e promover excelência operacional”.

Sabe-se que o compartilhamento do conhecimento é uma característica fundamental da espécie humana. Este é um fator importante da sobrevivência da espécie. Isso pode ser observado pelos relatos de Andy Jillings, que descreveu e filmou o comportamento dos índios Zoe, na Amazônia brasileira. “Voltando da floresta, um homem imediatamente vai para sua rede e relata tudo o que viu. Assim, informações sobre deslocamento da caça, condição dos rios e quais frutas estão amadurecendo são compartilhadas”.

Assim, pode-se acrescentar que o conhecimento é um patrimônio que deve estar em um mesmo plano, e não ser uma pirâmide. Ou seja, se o conhecimento estiver em um mesmo plano, pode ser compartilhado por todos, sem processos que dificultem o seu acesso ou estabeleçam níveis hierárquicos. Observa-se, muitas vezes, empresas com grandes reservatórios de conhecimento individual, não compartilhado com o coletivo da empresa. A percepção é que um conhecimento retido protege a pessoa que o detém, pois ela, além das questões de vaidade pessoal, tem receio de que outros possam produzir algo

mais valioso e que agregue mais valor naquele processo se o conhecimento que ela possui for compartilhado.

O grande desafio das organizações é criar ambientes que propiciem o compartilhamento do conhecimento e que exigem transformar informações e habilidades em atitudes e em paixão. Criar um ambiente que transforma conhecimento pessoal e implícito em conhecimento tangível, compartilhado, explícito, que possa durar e contribuir para os resultados das organizações. Existe uma pergunta que nos provoca e nos leva a refletir se o lucro de uma empresa é decorrente da “competência gerencial, de implementações de políticas bem administradas e da capacidade de formular planos de longo prazo e de executar movimentos táticos e estratégicos adequados?”. Como dizem Jim Collins e Jerry Porras no livro *Feitas para durar*, publicado em 1994, “a lucratividade é uma condição indispensável para a sobrevivência da empresa, e um meio importante para atingir seus objetivos, mas não deve ser o objetivo em si”.

Existem várias ferramentas que permitem instrumentalizar a gestão do conhecimento com a adoção de soluções criativas para organizar, sistematizar e distribuir a informação para todos os seus profissionais. Essas ferramentas estão representadas pelos indicadores balanceados de desempenho, conhecidos como *Balanced Scorecard*, ferramenta desenvolvida na década de 1990 por dois professores da Harvard Business com a proposta de maximizar resultados, tomando-se como base quatro perspectivas que refletem a visão e a estratégia empresarial: financeira, clientes, processos internos, aprendizado e crescimento. Além disso, é necessário ter em mãos o mapa de competências dos profissionais da empresa, identificar quem sabe o que e tornar essas competências acessíveis a todos os profissionais da organização; também é importante um arquivo de lições aprendidas e experiências vividas na empresa, gestão por processos, bancos de melhores práticas, *benchmarking*, trabalhos em grupo, internet, intranet, além da universidade corporativa, entre outros meios. Cada um dos instrumentos citados tem uma função e se complementam. O programa de educação continuada pode utilizar diversas ferramentas, como aulas presenciais, virtuais e *e-books*. Deve-se ressaltar que esse programa deve estar alinhado às avaliações de desempenho das equipes e às competências que se deseja desenvolver nos colaboradores, além de estar em consonância com o planejamento estratégico da empresa. As universidades corporativas formalizam o conhecimento de fora, ao contrário das academias corporativas, que têm o objetivo de formalizar o conhecimento interno. O intercâmbio de conhecimentos e de experiências ou a participação como representantes da empresa ou de entidades de classe também

é uma forma de gestão do conhecimento. Evidentemente, formações específicas buscadas pelo colaborador para seu desenvolvimento e autodesenvolvimento são bastante agregadoras e constituem-se em grande diferencial dentro das universidades corporativas.

Não se pode e nem se deve ainda esquecer o papel da tecnologia da informação (TI) na gestão do conhecimento, embora existam empresas que utilizem a TI como fator de competitividade, confundindo-a com gestão do conhecimento. Há empresas que acreditam que a TI sozinha pode servir para gerenciar o conhecimento, o que é equivocado. A TI desempenha papel de infraestrutura, enquanto a gestão do conhecimento envolve aspectos humanos. No entanto, o papel da TI é realmente dar suporte às ações da gestão do conhecimento, ampliando seu alcance e aumentando a velocidade da transferência desse conhecimento.

Atualmente, as empresas gastam de 3 a 5% da folha de pagamento com a educação continuada de seus profissionais. No grupo Fleury, por exemplo, a trajetória de crescimento foi a mola propulsora para que se criasse uma universidade corporativa. O grupo investe na educação corporativa desde 1993, com a proposta de manter o padrão de excelência e a sua cultura.

Além das ferramentas citadas para gestão do conhecimento, há outra relação de mudanças que deve ser adotada quando se deseja, por exemplo, buscar conhecimento específico; descentralização e reduzir o número e níveis da estrutura organizacional; investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), além da melhoria do processo de comunicação interno e externo da empresa. Empresas que produzem e gerenciam conhecimento são mais competitivas.

Uma pesquisa realizada pela revista HSM Management em 2004 com 400 executivos brasileiros, na qual a pergunta “você aplica gestão do conhecimento em sua empresa?”, colocada para esses executivos, revelou que 8% não aplicavam, 34% disseram que não, mas que pretendiam aplicar, 30% disseram que sim, mas de forma informal e apenas 28% disseram que aplicavam formalmente a gestão do conhecimento em suas empresas. Apesar dos números observados em relação àqueles que formalmente aplicavam a gestão do conhecimento, observa-se que, nos próximos anos, 92% dos executivos vão aplicar essa gestão em suas organizações. Buscou-se avaliar também, na mesma pesquisa, os impactos que essa gestão pode trazer sobre as empresas nos próximos anos e 40% dos entrevistados revelaram que isso “ditará quais empresas serão vencedoras”. Outro dado importante observado foi o resultado da questão a respeito do que os líderes buscam com a adoção da gestão do conhecimento nas empresas: 80% revelaram que esperam obter “melhor aproveitamento do conhecimento já existente.”

O maior beneficiário dessa gestão do conhecimento é a própria organização. Dessa forma, elas uniformizam os conhecimentos e crescem de forma coletiva, o que é um valioso segredo das grandes organizações.

“A aprendizagem é apenas uma das variáveis que influenciam o desempenho”, conforme citou Mednick. Quando se aumenta a recompensa, o profissional pode melhorar seu desempenho, mas, para isto, ele não necessitou aprender nada, tão somente repetiu várias vezes aquilo que já sabia.

A inovação é essencial à sobrevivência das organizações. No entanto, ela não vem de máquinas ou ativos da empresa. A inovação vem das pessoas que constituem o patrimônio intangível das organizações. Portanto, investir em treinamento e desenvolvimento é um aspecto de suma importância para desenvolver competências e abrir oportunidades para a inovação por meio do conhecimento. Para isso, são importantes aspectos como: atitude de aprendizado, liderança, trabalho em equipe, comunicação participativa e prazer em realizar o trabalho. Contudo, de nada adiantam essas ações se o profissional não tiver um comportamento inovador. Para estimular esse comportamento, as organizações precisam aprender a lidar com os transgressores. De acordo com Alter (apud Daniel e Vargas), “a inovação é sempre, em um primeiro momento, transgressão das regras estabelecidas, porque ela representa um atentado à ordem social”. Assim, o indivíduo inovador está sempre tentando transgredir os limites impostos pelas regras e normas mesmo que esteja de acordo com os objetivos gerais e particulares da organização. Assumir riscos é uma característica do profissional inovador. A aceitação do risco, ainda segundo Alter, pode ocorrer em três dimensões:

- Na relação com os colegas: sua atitude inovadora pode custar a perda de aprovação pelos membros de sua equipe de trabalho.
- Em relação às regras: o descumprimento dos padrões pode implicar sanções administrativas.
- Na avaliação do trabalho: pessoas inovadoras são mais cobradas para atingir melhores resultados a custos mais baixos.

Conclui-se, então, que o comportamento inovador está sempre jogando com as forças criadoras e as formas de socialização da organização. Assim, esse comportamento pressupõe capacidade de negociação, sendo crítico na realização de tarefas e nas relações interpessoais. Um comportamento inovador sabe lidar com as situações ambíguas; o que é e o que não é permitido, bem como aquilo que deve ou não deve ser feito.

Para ser uma organização inovadora, é necessário incentivar o comportamento inovador. Assim, a aceitação de riscos, a negociação, a construção crítica e a capacidade de conviver com a ambiguidade devem orientar ações das lideranças. Entre os obstáculos ao comportamento inovador, tem-se, por exemplo, o profissional que não domina os conhecimentos relacionados com a sua atividade na empresa e que tem pouca experiência, de modo que não pode ter um comportamento inovador. O hábito de pensar com base em regras preestabelecidas também é um obstáculo. Organizações burocráticas reprimem fortemente o comportamento inovador e, em geral, possuem uma liderança autoritária. Atitude pessimista também é um entrave ao comportamento inovador. O mesmo se pode considerar de pessoas que não cultivam o hábito de pensar e preferem soluções prontas ou que ficam em total bloqueio diante da opinião do líder. Predominância de critérios de julgamentos conservadores nas organizações podem ser obstáculo ao pensamento inovador dos profissionais.

Vive-se na era da gestão do capital intelectual e da busca incessante para atrair e preservar o conhecimento existente nas organizações e, a partir dele, gerar inovações usando a criatividade. Dessa maneira, o processo de ensino e aprendizagem é uma importante estratégia na dinâmica das organizações. Cabe ao líder desempenhar o papel de facilitador da aprendizagem de indivíduos e equipes.

Paulo Freire, em um bate-papo em Catuba (Vila Alpina, SP), expressou a importância da postura diante das práticas populares, pois não basta “querer mudar” a sociedade, é importante “saber mudar”, e mais, saber mudar em uma direção de igualdade e liberdade. É importante considerar que não se necessita querer mudar, mas deve-se agir com sabedoria para fazê-lo e isso implica mudança de pensamento para, dessa forma, mudar o comportamento. Não é possível imprimir uma gestão do conhecimento sem mudar o pensamento dos profissionais, de modo que se tornem receptivos e participativos aos conhecimentos que a empresa oferece por meio de programas de educação continuada que, na maioria das vezes, cumpre tão somente o papel de atender exigências normativas de alguma certificação ou acreditação ou, ainda, atender a uma legislação específica, como a RDC 302, de modo que que essa atividade não resulta, para a empresa, em uma importante ferramenta para o crescimento e desenvolvimento de suas equipes e para a busca pela melhoria contínua de seus processos.

Existe um provérbio chinês que diz: “se queres colher em três anos, planta trigo. Se queres colher em dez anos, planta uma árvore. Mas se queres colher para sempre, desenvolve um homem”. Sabe-se que o mercado é cada vez mais competitivo, no qual informações e tecnologia estão globalizadas e as organi-

zações procuram um diferencial competitivo. A resposta está na capacitação do melhor patrimônio da empresa: os profissionais que nela trabalham. Para manter um adequado nível de produtividade, é necessário ter profissionais bem preparados para dar retorno aos investimentos feitos pela empresa na captação e fidelização de seus clientes.

O processo de educação continuada é uma importante ferramenta para o desenvolvimento das competências que se deseja implementar nos colaboradores. É importante que eles estejam estimulados para perceber a importância da educação continuada na sua vida profissional, promovendo, dessa forma, seu autodesenvolvimento. Essa conscientização nem sempre é percebida e valorizada da maneira como os líderes gostariam mas deve, por intermédio deles, encontrar mecanismos para essa integração e conscientização da necessidade. São necessárias pessoas que sejam capazes de ir além da competência, ou seja, profissionais metacompetentes, que estão além das competências exigidas para suas atividades no laboratório. Entretanto, deve-se estar atento para o fato de que, apesar de o treinamento e o aprimoramento dos profissionais da organização nunca terem sido tão necessários como atualmente, as qualidades humanas não podem ficar em primeiro plano.

Existe um erro conceitual que abrange a grande maioria das organizações em que o setor de recursos humanos (RH) tem exclusivamente a tarefa de selecionar, contratar, treinar e remunerar os profissionais da organização. A função desse departamento vai muito além. Algumas empresas já colocaram o RH como um departamento estratégico. O departamento de RH é a ligação entre o mais alto nível hierárquico da empresa e os seus profissionais. Muito além de treinar, o setor de RH precisa saber incentivar e proporcionar o aprendizado e o crescimento profissional e pessoal da equipe de colaboradores.

O treinamento e desenvolvimento de pessoas é um processo delicado, que exige esforço na conscientização e mobilização dos profissionais, além do conhecimento claro das competências que se quer desenvolver naqueles colaboradores. Uma parte do treinamento, é claro, está focada em aspectos convencionais de conhecer o processo no qual o colaborador vai trabalhar, para que ele entenda bem como funciona e tenha conhecimento das atividades que estão interligadas a sua. Quais as entradas, as transformações e o processo seguinte. Conhecimento do cliente e do fornecedor. Depois que essa parte estiver feita e ele já estiver familiarizado com as informações básicas necessárias, é preciso partir para o processo de proporcionar aprendizado e crescimento de cada colaborador como pessoa – e isso

eleva a ideia de desenvolvimento a outro patamar, muito além das concepções tradicionais de treinamento, que pode trazer muito mais leveza, diversão e motivação, não apenas para os próprios funcionários, mas também para a empresa de modo geral. Esse ambiente é criado por meio do *coaching*, um processo que utiliza técnicas, ferramentas e recursos de diversas ciências, sendo, na verdade, um *mix* de recursos e técnicas que funcionam em ciências do comportamento (psicologia, sociologia, neurociências) e que tem como grande proposta atingir metas, solucionar problemas e desenvolver novas habilidades.

Enquanto treinamento é um processo de assimilação de conhecimentos em curto prazo que tem como objetivo reciclar ou repassar conhecimentos, habilidades ou atitudes diretamente relacionados à execução de tarefas, o desenvolvimento relaciona-se com crescimento, evolução e melhoria contínua. O foco do processo é desenvolver talentos, possibilitando que as potencialidades afluam e se desenvolvam até o nível que se quer alcançar. Enquanto o treinamento prepara para a execução de tarefas, o desenvolvimento apresenta para o colaborador possibilidades de visualizar novos horizontes e o prepara para voos mais altos.

Na área de diagnóstico laboratorial, é preciso, como início do processo de treinamento e desenvolvimento, seguir etapas estruturadas para a obtenção dos resultados desejados. Em primeiro lugar, deve-se fazer um diagnóstico e, nesse aspecto, a avaliação de desempenho dos colaboradores pode ser importante.

A avaliação de desempenho é uma importante ferramenta de gestão de pessoas. Corresponde à análise do desempenho profissional em função das atitudes comportamentais, atividades que realiza, metas estabelecidas e resultados alcançados e potencial de desenvolvimento. Seu principal objetivo é contribuir para o crescimento pessoal e profissional das pessoas na organização. O resultado final da avaliação de desempenho deve apresentar as informações necessárias para a identificação de oportunidades de melhoria e a elaboração de um plano de ação em relação a vários níveis da empresa, além de definir desenvolvimento de competências por área e individuais.

Outra maneira de identificar as necessidades pode ser por meio da aplicação de questionários, entrevistas com o colaborador e aplicação de testes teóricos ou práticos. Novos colaboradores exigem que se aplique um programa de treinamento, que são necessários também quando a empresa passa por mudanças significativas na rotina, novos equipamentos, acidentes de trabalho ou protocolos de biossegurança, etc.

Levantadas as necessidades, faz-se o planejamento, elencando as prioridades.

Os treinamentos, dependendo das competências que se queira desenvolver, podem ser aplicados por profissionais mais experientes ou podem-se contratar terceiros para aplicação dos treinamentos *in company*, dependendo dos recursos da empresa. Participação em congressos, *workshops* e cursos com temas da área também podem ser alternativas para treinar os profissionais do laboratório. Esses treinamentos podem ser apresentados em aulas expositivas, *workshops*, seminário, estudo de casos, palestra, *brainstorming*, painel integrado ou dinâmicas de grupo.

É parte importante desse processo a avaliação da atividade proposta para desenvolvimento das competências e a percepção do colaborador sobre o treinamento aplicado, não somente em relação ao conteúdo, como também ao facilitador. É uma avaliação de reação, uma vez que a avaliação do aprendizado somente é possível pela aplicação dos conhecimentos adquiridos e com a melhoria percebida na execução das tarefas do colaborador.

Podem-se também avaliar mudanças comportamentais do colaborador após a aplicação do treinamento e, por fim, a avaliação de resultados finais pode ser feita com a verificação do alcance das metas estabelecidas, de modo a conferir se ocorreu melhoria no processo após o treinamento.

Na microbiologia, o diagnóstico presuntivo é sempre um diferencial no prosseguimento das rotinas, visto que o profissional do setor de microbiologia deve ter suspeita do que pode ser isolado no material a ser processado, com o propósito de escolher os meios em que será semeado, temperatura e tempo de incubação, ambiente aeróbio, microaerófilo ou anaeróbio. Além disso, após o crescimento do micro-organismo, deve-se fazer a presunção do que se trata, com o propósito de estabelecer se é um micro-organismo Gram-positivo, Gram-negativo, bastonete ou coco, apenas para citar dois exemplos. Percebe-se, portanto, que a microbiologia é um setor, e não é o único, que exige treinamentos constantes, avaliações, duplas-observações e atualizações em documentos normativos ou instrutivos, como o documento do CLSI para o setor de microbiologia, que sofre modificações todos os anos, de maneira que os colaboradores de microbiologia devem ser treinados nesses documentos e orientações. Existem também mudanças taxonômicas que devem ser atualizadas, mecanismos de resistências que são descobertos a todo momento, além de mudanças das drogas antibióticas e quimioterápicas.

Por fim, deve-se concluir que treinar e desenvolver os profissionais não é custo para a empresa, mas, sim, investimento, considerando que, como afirma Galvin, *chairman* da Motorola, “o recurso fundamental dos negócios não é o capital, o trabalho ou as instalações. Os recursos básicos chamam-se conhecimento e

informação. Ideias são a chave do sucesso”. Portanto, investir no desenvolvimento do profissional é um investimento que dá maior e melhor retorno. Treinar é maximizar a qualidade de serviços e produtos por meio do desenvolvimento das pessoas. Como citou Shoshana Zuboff, em seu livro *The age of the Smart Machine*: “aprender é a nova forma de trabalhar. É o auge da atividade produtiva”.

A norma PALC v. 2013, no item 13 Gestão de Pessoal, subitem 13.2, estabelece na letra c, como requisito:

A Direção do laboratório ou seu responsável técnico tem a responsabilidade de:

c) oferecer programas de educação continuada para o pessoal técnico e administrativo do laboratório e participar em programas educacionais da instituição a qual pertence, quando aplicável.

No subitem 13.3, letra d, estabelece: “necessidade de treinamento e educação continuada”.

Ainda neste item, subitem 13.6, determina que “o SGQ deve contemplar um programa de avaliação de desempenho do pessoal nas tarefas que lhe foram atribuídas, com periodicidade definida em função das necessidades específicas do laboratório”.

REFERÊNCIAS NORMATIVAS BRASILEIRAS CONSULTADAS

1. Gestão da Fase Pré-analítica. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Gestão da Fase Pré-Analítica. Grafitto, 2010.
2. Ministério da Saúde. Resolução RDC no 302/205 – Regulamento Técnico para funcionamento dos Laboratórios Clínicos. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancado-paciente/documentos/rdcs/RDC%20N%C2%BA%20302-2005.pdf>. Acessado em: 24 abr 2014.
3. Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos. Norma PALC v. 2013. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial.

REFERÊNCIAS NORMATIVAS INTERNACIONAIS CONSULTADAS

1. NCCLS/CLSI. Training and Competence Assessment; Approved Guideline. 3.ed. NCCLS/CLSI document QMS03-A3. Wayne: 2009.

BIBLIOGRAFIA

1. Alter N. Inovação, risco e transgressão nas organizações. In: Daniel E, Vergara SC. Gestão

- com pessoas e subjetividade. São Paulo: Atlas, 2000. p.59-78.
2. Avaliação de Desempenho. Disponível em: <http://equestiona.com/pt-br/avaliacao-de-desempenho/>. Acessado em: 12 abr 2014.
 3. Coaching e Carreiras. Disponível em: <http://www.ibccoaching.com.br/tudo-sobre-coaching/coaching-carreira/>. Acessado em: 06 abr 2014.
 4. Collins JC, Porras JI. Feitas para durar – Práticas bem-sucedidas de empresas visionárias. Rio de Janeiro: Rocco, 1995.
 5. Easton J, Johnson R. Como treinar equipes com eficiência. São Paulo: Publifolha, 2001.
 6. Freire P. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. São Paulo: Paz e Terra, 1996.
 7. Mendes ME et al. Gestão por processos no laboratório clínico – uma abordagem prática. São Paulo: EPR, 2006.
 8. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Educação Corporativa. Disponível em: <http://www.educor.desenvolvimento.gov.br/universidades>. Acessado em: 5 abr 2014.
 9. Molle CM. O lado humano da qualidade – Maximizando a qualidade de produtos e serviços através do desenvolvimento das pessoas. São Paulo: Pioneira, 1992.
 10. Robbins SP et al. Comportamento organizacional – teoria e prática no contexto brasileiro. 14.ed. Pearson, 2012.
 11. Ross J. Não deixe a porta aberta – HSM Management Update nº 30. Março 2006.

13. Gestão de equipamentos no laboratório de microbiologia

INTRODUÇÃO

Cabe aos dirigentes laboratoriais uma compreensão clara sobre qual é o papel desempenhado pelo serviço de microbiologia clínica na comunidade e para o negócio, de sua capacidade de produção e os meios que dispõem para realizá-la, de como funciona essa fatia do mercado, qual o valor agregado pelo laboratório de microbiologia para a relação do laboratório com o corpo clínico solicitante, como é possível se diferenciar para ganhar mais posições no mercado em que atuam e fidelizar os clientes. Esse entendimento torna-se fundamental, pois age como regra de sobrevivência do laboratório.

Os lançamentos constantes de novas tecnologias e equipamentos e de novos ensaios laboratoriais requerem uma preocupação dos gestores laboratoriais em avaliar os riscos e criar mecanismos para evitarem determinados tipos de falhas que podem ter consequências drásticas para os clientes. Isso se destaca quando se pensa nos equipamentos, cujo mau funcionamento pode até mesmo significar riscos à vida do paciente.

A gestão de equipamentos, em especial os vinculados à produção laboratorial em microbiologia, é um elemento-chave para produtividade, qualidade, confiabilidade dos resultados, custos da produção sob controle e segurança dos pacientes. O gerenciamento competente dos equipamentos é uma necessidade primordial para a realização de boas práticas de laboratório clínico, manutenção da sua competitividade e sustentabilidade do negócio.

Para que se cumpra o desafio de promover as ações necessárias ao conjunto de máquinas conservado e em condições adequadas, são necessários empenho e comprometimento com essa causa. Isso implica criar modelos para adminis-

trar os equipamentos, preparar pessoas para essa tarefa, implantar a cultura de monitoramento, medições e análise de dados. O gestor do laboratório de microbiologia deve se adaptar à nova realidade também na área tecnológica. Dada a importância que o parque tecnológico alcançou na prática laboratorial de microbiologia e das repercussões que eventuais falhas podem trazer para o diagnóstico, o tratamento e o monitoramento de pacientes, entende-se a razão deste capítulo.

PLANEJAMENTO NA GESTÃO DE EQUIPAMENTOS

Entendendo-se o laboratório como um processo complexo e dinâmico, para que se possa atingir êxito em sua operação, é necessário empregar a ferramenta do planejamento para se projetar o futuro.

Um dos objetivos deve ser desdobrado para a gestão de equipamentos, posto que eles são parte fundamental para o cumprimento de bons resultados pelo laboratório. Uma estratégia própria deve ser estabelecida em virtude da relevância e particularidade, envolvendo: inovação tecnológica, aspectos metrológicos, planos de manutenções preventivas, previsões de redundâncias nos equipamentos críticos, planos de contingências para situações de excepcionalidade, estoque de peças de reposição, contratos de prestação de serviços com nível de acordo com serviços estipulados previamente com fornecedores qualificados. Trata também da capacitação contínua da equipe que opera esses equipamentos, das interações com a tecnologia da informação (*hardware, software, middleware*, administração de redes lógicas) e investimentos em segurança e saúde do trabalhador.

Um bom planejamento para o parque de equipamentos de um laboratório gera ações de melhorias baseadas em dados devidamente monitorados, diminui custos por meio da prevenção de falhas, garante maior disponibilidade dos equipamentos, evita que os problemas tornem-se crônicos, promove a eliminação de retrabalho, garante os prazos para execução dos serviços e promove a sistematização de tarefas realizadas por técnicos competentes, além de cumprir o orçamento previsto. Tudo isso beneficia o laboratório pela incorporação da prevenção de falhas, pela adoção de atitudes de cooperação e pelo trabalho em equipe, criando-se uma atmosfera de busca constante pela satisfação dos clientes.

AVALIAÇÃO DE NOVAS TECNOLOGIAS

A avaliação de tecnologias em saúde é um processo complexo e abrangente de investigação das consequências clínicas, econômicas e sociais da sua utilização, desde a pesquisa até a sua obsolescência.

Ainda que as preocupações tradicionais com a qualidade da assistência à saúde, a cobertura e o acesso aos serviços permaneçam importantes, cada vez mais os responsáveis pelas decisões no setor, no âmbito público ou privado, preocupam-se em obter melhores resultados com os recursos disponíveis. Esse tipo de abordagem se deve, principalmente, aos custos crescentes da saúde frente a recursos sempre limitados, à pressão de consumidores mais organizados e exigentes e à identificação de fontes de desperdícios na prestação de serviços de saúde.

Essa tendência se traduz pela aplicação de técnicas econômicas de avaliação, como a análise custo-benefício ou análise de custo-efetividade. Quando bem realizadas, geram conhecimentos fundamentados científica e metodologicamente sobre efetividade, utilidade, benefício e eficiência, de modo que auxiliam os gestores laboratoriais a escolher entre as alternativas tecnológicas existentes.

A sistematização proposta por Mendes em 2007 é uma sugestão de roteiro a ser utilizado na introdução de nova tecnologia na prática laboratorial (Figura 1).

- | |
|--|
| <p>Roteiro para introdução de nova tecnologia</p> <ul style="list-style-type: none">• Análise da produção e produtividade: atual e futura• Análise dos tempos totais de atendimento (TAT): atuais e futuros pretendidos• Análise dos recursos humanos existentes• Análise das instalações atuais e requeridas pela nova tecnologia• Análise do fluxo da rotina de trabalho na qual a nova tecnologia será inserida: urgência, rotina, pesquisa• Avaliação dos materiais biológicos a serem utilizados pela nova tecnologia• Avaliação das metodologias ofertadas e disponíveis no mercado• Programa de manutenções e calibrações requeridas pela nova tecnologia• Análise do impacto ambiental: resíduos gerados e integração com o meio ambiente (ruídos, poluição visual, aquecimento no ambiente, etc.)• Análise dos riscos ao trabalhador• Análise de custos e riscos financeiros• Formas e prazos de pagamento• Retorno financeiro• Benefícios para a qualidade dos serviços prestados• Benefícios para a clientela com a introdução da nova tecnologia (usuários, médicos, fontes pagadoras, sistema de saúde)• Benefícios para os funcionários e acionistas da empresa |
|--|

FIGURA 1 Sistematização proposta por Mendes para a introdução de nova tecnologia na prática laboratorial.

Destaque-se a importância do planejamento e da preparação das instalações para a incorporação de novas tecnologias: hidráulica, elétrica, redes lógicas, umidade, ventilação, carga térmica, tubulações de gases e gases.

Com informações corretas, detalhadas e documentadas pelo fabricante e compreendidas pelos envolvidos no laboratório, o fluxo da instalação não terá prejuízos, evitando-se discussões e danos posteriores ao relacionamento com o fornecedor.

IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO DE EQUIPAMENTOS

A validação de novas tecnologias propicia que a equipe do laboratório conheça em profundidade suas características operacionais e familiarizem-se com o novo método de maneira sistematizada e documentada. É importante que essa caracterização da nova metodologia ou tecnologia ocorra antes da sua utilização na rotina diagnóstica. Recomenda-se que cada processo de validação seja tratado como um projeto, elaborando-se um plano de validação (Figura 2).

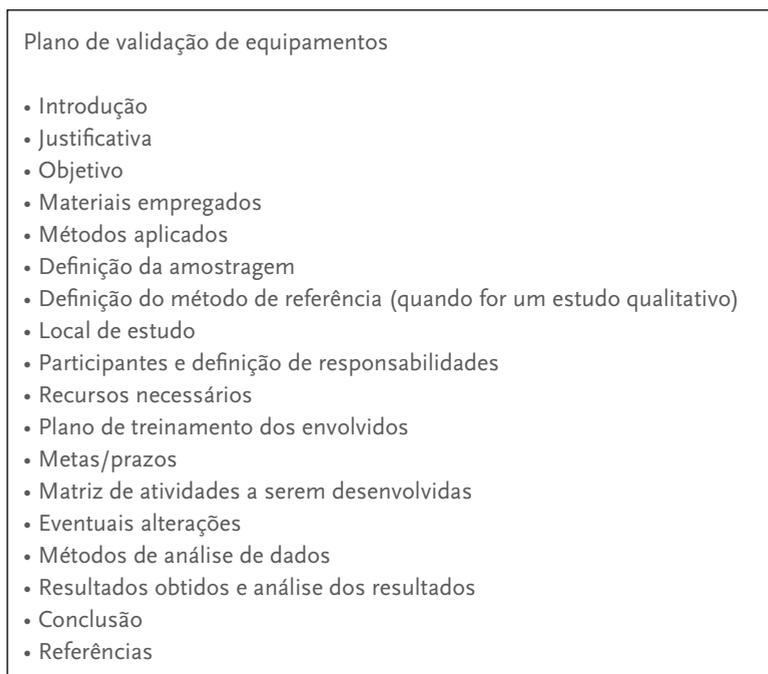


FIGURA 2 Plano de validação de equipamentos.

ROL DE EQUIPAMENTOS

O conjunto de equipamentos deve ser conhecido em profundidade e identificado corretamente para que se efetue o planejamento. Por isso, em alguns casos, é preciso iniciar pela realização de uma inspeção completa, a fim de se elaborar um inventário do parque tecnológico instalado, gerando-se uma listagem dos equipamentos (em papel ou planilha eletrônica) contendo o descritivo das condições de cada um deles com modelo, marca, número de série, data de introdução no laboratório, quantidades e estado de conservação. Podem-se agrupar os equipamentos por modelos e marcas similares, catalogando-os por famílias. Esse rol deve estar atualizado em relação à movimentação, ao monitoramento do uso dos equipamentos, à verificação do nível de obsolescência, à substituição e à retirada de equipamentos, seja para reparos externos ou pelo final da sua vida útil (Figura 3).

Na sequência, deve-se discutir com os fabricantes as diretrizes para implantação de um programa de manutenção preventiva, frequência de realização das manutenções e necessidade de eventuais trocas de peças. Se o equipamento for recém-adquirido pelo serviço, é obrigação do fabricante, além de cumprir o período de garantia contratual, fornecer essas informações, juntamente com os manuais de operações e de instalação em português. Esses manuais precisam ficar disponíveis e acessíveis como fontes de consultas à equipe técnica e às equipes de manutenções, sempre que necessário. Com isso é possível elaborar os procedimentos operacionais padrão de cada equipamento.

Atenção especial deve ser dada aos equipamentos definidos como críticos, ou seja, aqueles que afetam diretamente a qualidade do produto final, que podem servir de gargalos à produção laboratorial, gerando paradas não programadas e prejuízos. Para defini-los, alguns critérios, apontados por Couto et al., devem ser estabelecidos pelo gestor do laboratório de microbiologia: quantidade de equipamentos existente, disponibilidade de mão de obra, risco às instalações, riscos aos funcionários, riscos à segurança dos pacientes, riscos à produção, riscos ao meio ambiente e riscos à imagem do laboratório. Por isso, no rol de critérios, deve constar o item criticidade.

PRONTUÁRIO DOS EQUIPAMENTOS

Este documento, que descreve todo o ciclo de vida do equipamento desde a sua introdução até a sua exclusão do parque ativo, é importante e traz segurança a todos (proprietários, fabricantes, prestadores de serviços, equipe técnica do laboratório de microbiologia e fontes pagadoras dos exames).

Além do descritivo do equipamento, constam as condições iniciais da instalação, todo o histórico de manutenções e calibrações, todo tipo de intervenção executada, atualizações de *software*, com o descritivo de avarias, reparos, incidentes e demais ocorrências.

PROCEDIMENTOS PARA OPERAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

Os procedimentos relativos aos equipamentos são indispensáveis na uniformidade operacional, possibilitando seu uso de acordo com as instruções dos fabricantes. Devem ser claros, diretos e completos, fornecendo informações que permitam práticas seguras no seu manuseio.

Seu conteúdo pode ser definido pelo gestor do laboratório de microbiologia ou pela equipe da gestão da qualidade. Não se deve esquecer: fundamentos da tecnologia, passo a passo da operação funcional, itens de verificações nas atividades de manutenção, abastecimento de água reagente, critérios de liberação do equipamento para a rotina, contatos das oficinas responsáveis, contingências e como destinar os resíduos/efluentes gerados.

PLANO DE MANUTENÇÃO PREVENTIVA

Um programa de manutenções preventivas dos equipamentos é conduzido a intervalos predeterminados, seguindo-se as instruções dos fabricantes sobre cuidados rotineiros com os equipamentos. Esses procedimentos podem ser executados pelos operadores, mediante treinamento prévio, ou por terceiros qualificados.

Um cronograma de trabalho é estabelecido e as ações acontecem de acordo com esse esquema proposto. Constam minimamente: data prevista, famílias de equipamentos, periodicidade de realização, tarefas a serem realizadas, responsáveis, parâmetros de controle e situação atual (Figura 4).

| Mês/Ano | Famílias | Frequência | Tarefas | Controle | Oficina/responsável | Situação atual | Observação |
|-----------|----------|------------|---------|----------|---------------------|----------------|------------|
| Janeiro | | | | | | | |
| Fevereiro | | | | | | | |
| Março | | | | | | | |
| Abril | | | | | | | |
| Maior | | | | | | | |
| Junho | | | | | | | |
| Julho | | | | | | | |
| Agosto | | | | | | | |
| Setembro | | | | | | | |
| Outubro | | | | | | | |
| Novembro | | | | | | | |
| Dezembro | | | | | | | |

FIGURA 4 Planilha de planejamento anual de manutenção preventiva.

PLANO PERIÓDICO DE CALIBRAÇÕES E VERIFICAÇÕES

Para os equipamentos de medições que exigem confiabilidade das medidas executadas, existem as calibrações e suas verificações periódicas dentro de critérios metrológicos.

No laboratório de microbiologia, as famílias de equipamentos consideradas como calibráveis são habitualmente: termômetros, termo-higrômetros, geladeiras, *freezers*, estufas bacteriológicas, estufas com CO₂, banhos-maria, blocos térmicos, micropipetas, réguas, balanças, conjuntos de massa, manômetros e termômetros de autoclaves, centrífugas não refrigeradas, centrífugas refrigeradas, cronômetros, balões volumétricos, condutivímetros, pHmetros e cabines de segurança.

Para esse conjunto de equipamentos ou instrumentos, elabora-se o “Plano periódico de calibrações e verificações”, envolvendo todos os equipamentos de medições existentes passíveis de calibrações e verificações; nele, devem estar apontados: código identificador do equipamento calibrado, localização do equipamento, grandeza calibrada, data da última calibração, data da próxima calibração, periodicidade de verificações, responsáveis pelo equipamento e empresa responsável pela calibração (Figura 5).

Para algumas grandezas, alguns desses serviços podem ser efetuados dentro do próprio laboratório, desde que haja padrões e pessoal habilitado, mas esse não é o *core business* de um serviço de microbiologia, por isso habitualmente recorre-se ao serviço de terceiros. A empresa que executa esses serviços precisa ser qualificada e deve pertencer preferencialmente à Rede Brasileira de Calibrações, credenciada pelo Instituto Nacional de Metrologia (Inmetro).

Ao receber o certificado de calibração, recomenda-se que ele seja analisado antes de se colocar o equipamento em uso novamente. A análise dos dados do certificado de calibração baseia-se na comprovação dos resultados da calibração para assegurar que os valores medidos permanecem dentro dos limites de tolerância aceitável para o uso pretendido.

| Mês/Ano | Codificação do equipamento | Localização | Grandeza | Data da última calibração | Data da próxima calibração | Frequência de calibrações | Responsáveis | Oficina |
|-----------|----------------------------|-------------|----------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------|---------|
| Janeiro | | | | | | | | |
| Fevereiro | | | | | | | | |
| Março | | | | | | | | |
| Abril | | | | | | | | |
| Maior | | | | | | | | |
| Junho | | | | | | | | |
| Julho | | | | | | | | |
| Agosto | | | | | | | | |
| Setembro | | | | | | | | |
| Outubro | | | | | | | | |
| Novembro | | | | | | | | |
| Dezembro | | | | | | | | |

FIGURA 5 Planilha do plano periódico de calibrações e verificações.

O controle das manutenções e calibrações de equipamentos pode ser executado com planilhas preparadas no computador do próprio laboratório ou por programas de computador (*softwares*) específicos de gestão de equipamentos disponíveis no mercado e distribuídos por empresas especializadas no desenvolvimento desses tipos de programa. É importante que haja um monitoramento rigoroso nessas atividades pela equipe do laboratório, para que os equipamentos estejam operando dentro de suas especificações.

PROVISÃO DE RECURSOS PARA O DESENVOLVIMENTO DO PLANEJAMENTO

Os recursos laboratoriais representam todos os meios colocados à disposição da organização que sejam necessários à realização das suas atividades. O bom gerenciamento de equipamentos está, em grande parte, espelhado pelo uso racional dos recursos, que sempre são menores do que o desejado. Entendem-se como recursos pessoas, materiais, finanças, infraestrutura disponível, instalações e tecnologias. A direção do laboratório de microbiologia identifica os recursos necessários para uma gestão de equipamentos adequada, estabelece como eles serão alocados e define sua liberação dentro dos prazos estipulados.

A distribuição dos recursos é feita dentro dos tópicos propostos: adequações de infraestrutura, inovações tecnológicas, manutenções preventivas e corretivas, aspectos metrológicos, treinamento e capacitação, calibrações, redundâncias e contingências, interações com a tecnologia da informação (*software, middleware, hardware*, tecnologia de redes, segurança da informação), contratação de prestadores de serviços qualificados, reposição de peças e monitoramento.

CAPACITAÇÃO E EDUCAÇÃO CONTINUADA DOS OPERADORES DE EQUIPAMENTOS

Os colaboradores devem ser treinados, adequadamente preparados e avaliados como aptos para operar as tecnologias disponibilizadas na produção dos exames microbiológicos.

Um plano de treinamento deve ser cumprido com a finalidade de manter o quadro funcional atualizado dentro do que se pretende para a sua atividade.

As atitudes requeridas para trabalhar com o parque tecnológico no laboratório de microbiologia são compromisso, flexibilidade, determinação e proatividade, com colaboradores colocando-se à disposição para aprenderem e realizarem o melhor em benefício dos pacientes e do corpo clínico solicitante.

SEGURANÇA ELÉTRICA

O laboratório depende de energia elétrica para o seu bom funcionamento. A estrutura dos sistemas elétricos merece ser cuidadosamente observada e compreendida para que haja redução de riscos e economia de energia.

O quadro de energia deve ter livre acesso, deve ser mantido distante de lugares em que haja instalação de gás e precisa estar sempre limpo e ventilado. Os equipamentos elétricos devem ser ligados somente quando estiverem em condições de uso com segurança. Alguns cuidados básicos são apontados a seguir:

- O fio de alimentação precisa estar protegido.
- Verificação da voltagem e corrente elétrica do equipamento antes de ligá-lo à rede elétrica.
- A tomada elétrica deve estar plugada na voltagem compatível.
- É mandatório respeitar as orientações do fabricante.
- Deve-se evitar o uso de “benjamins” ou “T”, pois trazem sobrecarga às instalações e aquecimento dos fios, causando curto-circuitos.
- As variações de tensão na rede elétrica devem ser evitadas para que não haja prejuízos ao desempenho do equipamento.

PRÁTICAS SEGURAS PARA O MANUSEIO DE CUIDADOS COM OS EQUIPAMENTOS

A equipe técnica do laboratório de microbiologia, quando treinada adequadamente, adquire competência para a operação dos equipamentos. Isso não a isenta de proceder à leitura cuidadosa dos manuais de operação fornecidos pelos fabricantes e a documentação correspondente. Em consequência, no desenvolvimento das atividades, espera-se o cumprimento estrito das orientações e diretrizes definidas nos procedimentos que sistematizam o cotidiano.

O gestor do laboratório designa alguém da sua equipe para diligentemente acompanhar terceiros nas suas atividades de manutenção. Essa pessoa destina a eles as mesmas medidas de proteção que se destinam aos funcionários e recebe os relatórios sobre os serviços prestados.

Normas gerais de segurança preconizadas, como o uso de equipamentos de proteção individual (p.ex., avental, luvas, óculos protetores e máscaras), devem ser seguidas durante a operação dos equipamentos, além daquelas sugeridas pelos fabricantes.

Após o uso, os equipamentos devem ser desligados, limpos corretamente e desconectados da tomada, sempre que aplicável. A temperatura e a umidade do

ambiente em que se localiza o equipamento devem atender às especificações do fabricante e precisam ser controladas. Os equipamentos que geram calor, chamas ou altas temperaturas devem ser sinalizados. O mesmo cuidado deve ser tomado para equipamentos que trabalhem com baixas temperaturas. Os aparelhos sensíveis a ruídos e vibrações devem ser instalados em locais que atendam às orientações do fabricante. Os procedimentos de descontaminação devem ser realizados, sempre que aplicável, de acordo com o protocolo do fabricante ou aquele definido pela direção do laboratório de microbiologia.

PARTICULARIDADES NA GESTÃO DE AUTOCLAVES

A autoclavagem é um processo de esterilização que ocorre pelo vapor saturado sob pressão. O micro-organismo é destruído pela ação combinada de temperatura, umidade e pressão, promovendo termocoagulação e desnaturação proteica. Consiste em manter o material contaminado a um tratamento térmico, com temperaturas elevadas, em contato com o vapor de água, incluindo-se ciclos de compressão e decompressão, por um período suficiente para destruir os agentes patogênicos.

A norma ABNT NBR ISO 17665-1:2010 especifica requisitos para o uso de calor úmido no desenvolvimento do processo em sua validação e no controle da rotina de esterilização. A fase de qualificação divide-se em duas etapas:

- Para se qualificar a instalação da autoclave, é necessário comprovar se ela atendeu às exigências do fabricante, se tem a capacidade adequada aos objetivos de sua instalação, se as calibrações foram efetuadas, se foram realizados os testes de distribuição do calor ou de vazamento da câmara de vácuo sob pressão positiva e a determinação de fatores de desempenho físico.
- Para assegurar se o equipamento tem ou não funcionamento confiável, baseando-se em testes controles, alarmes, funções de monitoramento, indicadores de desempenho operacional, integridade da câmara de manutenção da pressão, manutenção do vácuo.

As autoclaves são equipadas com termômetros, manômetros e monovacuômetros, os quais indicam temperatura e pressão nas câmaras internas e externas. Esses instrumentos precisam ser calibrados e verificados periodicamente. A cada ciclo de autoclavagem, devem-se registrar a temperatura e a pressão.

Em consequência dessa etapa, são estabelecidos os critérios de aceitação para uso do equipamento. A cada carga a ser autoclavada coloca-se a fita ou etiqueta

sinalizadora de esterilização, a qual se altera em sua cor, quando o material é submetido à temperatura de 121°C. A mudança ocorre pela presença de substância química termossensível.

O teste de Bowie-Dick indica a retirada de ar da autoclave, demonstrando se a bomba de vácuo foi eficiente.

O controle de qualidade é feito com o uso de um indicador biológico de leitura rápida ou não. Os bioindicadores (esporos de bacilos termófilos em meio de cultura com indicador de pH) demonstram se a temperatura de 121°C foi atingida por pelo menos 15 minutos.

No plano de manutenções preventivas da autoclave, há atividades realizadas pelos operadores:

- Manutenção diária: limpeza das superfícies internas, filtro, carrinho e cesta.
- Manutenção semanal: remover a grelha do dreno, drenar o gerador de vapor, limpeza externa.

Parte dessas manutenções é efetuada por especialistas terceirizados:

- Manutenção mensal: limpeza do sistema de drenagem (purgadores, filtros), verificação do sistema de pressurização, do aterramento, inspeção das válvulas, checagem das conexões hidráulicas, verificação da porta, verificação dos sensores de temperatura.
- Manutenção semestral: verificação das válvulas de alívio de pressão e das válvulas de segurança.
- Manutenção anual: inspeção de vasos de pressão.

GESTÃO DE CABINES DE SEGURANÇA E CABINES DE FLUXO LAMINAR

As cabines de fluxo laminar são equipamentos de pequeno porte construídos para proteger o material que está sendo manipulado, ou seja, proteger o produto. Nesses equipamentos, a velocidade média do ar é fixa e predeterminada: de 0,45 m/s com tolerância de +/- 10%, de acordo com norma IEST – RP – 002.2, definida pelo Institute of Environmental Sciences and Technology. Esses equipamentos podem ter fluxo horizontal ou vertical, mas não há recirculação do ar. Todo ar que entra passa por um pré-filtro, segue por um filtro absoluto, pelo produto e sai do equipamento. De acordo com o IEST – RP – 002.2, todo equipamento de fluxo laminar deve ser certificado pelo menos uma vez ao ano

ou sempre que for movimentado. A certificação pode ter intervalos menores de periodicidade dependendo da criticidade de sua utilização.

Os módulos de fluxo laminar oferecem a mesma proteção ao produto manipulado, mas possibilitam o trabalho em ambientes maiores. Na certificação de fluxos laminares, os requisitos mínimos exigidos são:

- Ensaio de integridade: verifica a integridade do equipamento e do filtro HEPA. É fundamental, pois é o único teste que realmente desafia o equipamento.
- Ensaio do nível de ruído: é medido o nível de ruído do equipamento, que deve ser ≤ 67 Dba, desde que o nível de ruído do ambiente seja < 55 Dba.
- Ensaio de luminosidade: verifica a intensidade de luz da área de trabalho, que deve ser de no mínimo 800 lux/m^2 .
- Ensaio da contagem de partículas: mede o número de partículas em suspensão e classifica a área de trabalho. Deve ser < 3.520 partículas de $0,5$ microns por m^3 de ar, ISO 5 de acordo com ISO 14.644-1 (antiga classe 100 do Federal Standard 209e).
- Ensaio da velocidade do fluxo de ar: verificam-se velocidade e uniformidade do fluxo de ar pela área de trabalho. A velocidade média deve ser de $0,45 \text{ m/s}$ com tolerância de $\pm 10\%$.
- Ensaio do índice de saturação do(s) filtro(s) absoluto(s): verifica-se a perda de pressão dos filtros HEPA instalados. É um dos critérios para determinar a necessidade de troca do filtro HEPA.

As cabines de segurança biológica são equipamentos construídos e projetados para oferecer proteção ao produto manipulado, ao operador e ao ambiente em que estão inseridos, e o fluxo de ar é sempre vertical. Seu projeto, construção e certificação são estabelecidos pela norma NSF 49 (NSF International Standard/ American National Standard for Biosafety Cabinetry).

CLASSIFICAÇÃO DAS CABINES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

As cabines de segurança biológica dividem-se em três classes: classe I, classe II e classe III.

Classe I

- Similar às capelas de laboratório.
- 100% de exaustão por meio de filtro HEPA.

- Conhecida como barreira parcial.
- Não requer proteção do produto.
- Proporciona proteção somente do operador e do ambiente, ficando o produto exposto à contaminação proveniente do ar do laboratório.

Classe II

- Modelo utilizado em 99% das aplicações com risco biológico.
- Apresenta, além do filtro HEPA de exaustão, um filtro HEPA de insuflamento, garantindo proteção ao produto, ao operador e ao ambiente.
- Também é conhecida como barreira parcial.
- Seu projeto se divide em três categorias principais: tipo A1, tipo A2 e tipo B2.
- Tipo A2: 70% de ar recirculado no interior da cabine, 30% de ar exaurido por meio de filtro HEPA; o ar que sai do filtro HEPA de exaustão pode retornar para o laboratório. Indicada para trabalhos que envolvam risco biológico moderado ou que emanem quantidades pequenas de materiais voláteis e vapores.
- Tipo B1: 30% de recirculação no interior da cabine; 70% de exaustão pelo filtro HEPA, *plenum* de configuração separada, deve ser exaurido para o exterior.
- Tipo B2: 100% de exaustão por meio de filtro HEPA para o exterior sem recirculação de ar, ou seja, 100% de ar insuflado mais o ar admitido pela abertura frontal é exaurido para o ambiente externo, passando por filtro HEPA. É recomendada para trabalhos em tenham agentes biológicos de risco moderado, e também para manipulações que emanem gases e vapores, como quimioterápicos (citostáticos). O operador deve utilizar equipamento de proteção individual (EPI), segundo a norma regulamentadora do Ministério do Trabalho NR 32:2005.
- Tipo B3: 70% de recirculação no interior da cabine; 30% de exaustão por meio do filtro HEPA; deve ser exaurido para o exterior.

Classe III

- Empregada em aplicações especiais.
- 100% de exaustão por meio de filtro HEPA para o exterior.
- É conhecida como barreira total.
- Nesse equipamento hermeticamente fechado, o operador não tem contato direto com o produto.
- Apresenta um sistema de filtragem de insuflamento composto por dois estágios de filtragem com filtros HEPA; na exaustão, pode ter também dois estágios de filtros HEPA ou um estágio de filtro HEPA e um incinerador.

Essas proteções são garantidas pela recirculação do ar dentro dos equipamentos e todo ar que sai é filtrado por meio de filtros absolutos (HEPA), com eficiência mínima de 99,97% para partículas de 0,3 microns.

Há nesses equipamentos duas velocidades do ar: *downflow* e *inflow*:

- *Downflow*: velocidade do ar que passa pelo filtro absoluto de insuflamento e desce paralela e uniformemente até a mesa de trabalho. Essa velocidade não é determinada ou controlada por norma, mas, sim, pelo fabricante.
- *Inflow*: determinada vazão de ar em m³/h que entra por uma grade frontal (perfurações na mesa de trabalho). Ao entrar por essa abertura, é direcionada por baixo da mesa de trabalho, seguindo por um *plenum* na parte posterior do equipamento, juntando-se com a vazão de ar interna (*downflow*); ambas passam novamente pelo ventilador, que força o ar a passar pelos filtros absolutos de insuflamento e exaustão.

PONTO DE AJUSTE (SET-UP) DAS CABINES DE SEGURANÇA

A NSF49 especifica a velocidade de face mínima que deve ser ajustada nos vários tipos de cabines, mas não especifica a velocidade média mínima no plano definido pela borda inferior do visor frontal. Essa norma define o critério de avaliação da uniformidade do fluxo de ar neste plano, ou seja, qual a tolerância aceitável na leitura de velocidades.

Essa velocidade não é determinada pela NSF49, pois pode variar de acordo com a forma construtiva de cada modelo sem, no entanto, alterar o desempenho adequado das cabines.

Os fabricantes executam ensaios em cada modelo de cabine de segurança biológica que produzem e especificam o “ponto de ajuste” ou *set-up*. Velocidade média do fluxo descendente (*downflow velocity*) tem de ser definida pelo fabricante, que conhece o “ponto ótimo” de ajuste de suas cabines. Assim, os fabricantes ensaiam seus produtos, alterando as vazões de insuflação e de face até encontrarem o ponto de ajuste.

INFLUÊNCIA DA INSTALAÇÃO NO DESEMPENHO DAS CABINES DE SEGURANÇA

As especificações dos equipamentos, ao saírem da produção na fábrica, podem ser significativamente alteradas em campo, caso existam restrições ou interferências ao escoamento do ar.

Em cabines de segurança biológica classe II tipo A, com retorno de ar para o ambiente, a distância entre a parte superior do gabinete da cabine e o forro não deve ser menor que 255 mm, pois haverá prejuízo à uniformidade do fluxo de ar.

A localização e o dimensionamento inadequado das bocas de insuflação de ar do sistema de ar condicionado do laboratório podem gerar regiões com velocidades altas que, em contato com a cabine, alteram o seu desempenho.

Correntes de ar que advêm de aberturas de janelas e portas são causas prováveis de problemas, pois podem ter velocidades superiores a 1 m/s.

Como regra geral, estima-se que não é adequada a ocorrência de correntes de ar com velocidades que excedam a velocidade de face da cabine. É imperativo, então, que todas as fontes de fluxo de ar do laboratório sejam consideradas antes da instalação de uma cabine de segurança biológica, assim como o fluxo de pessoas e de materiais também deve ser verificado.

Recomenda-se que a instalação das cabines seja estacionária, ou seja, uma vez posicionada e certificada, ela não deve ser deslocada. Dessa forma, é importante reservar espaço atrás e dos lados da cabine para dar acesso aos serviços de limpeza, manutenção e certificação.

CERTIFICAÇÃO DE CABINES DE SEGURANÇA

Na certificação de cabines de segurança, a norma NSF49 especifica detalhadamente os testes recomendados.

- Ensaio da velocidade do fluxo de ar *downflow*: verifica a velocidade de insuflamento de ar após o filtro HEPA para a área de trabalho. O valor da velocidade média não é determinado pela norma; são determinados apenas a variação e o desvio-padrão.
- Cálculo da velocidade do fluxo de ar *inflow*: verifica a velocidade de entrada de ar pela abertura frontal. Para as cabines classe II tipo A1, a velocidade de *inflow* deve ser de no mínimo 0,38 m/s, para as cabines tipo A2 e B2 a velocidade de *inflow* deve ser de no mínimo 0,5 m/s.
- Ensaio de fumaça: verifica o “caminho” do ar dentro da área de trabalho e da área externa ao equipamento. Esse ensaio é utilizado para visualizar que todo o ar insuflado para a área de trabalho é recirculado/exaurido sem nenhuma fuga para o ambiente. É utilizado também para garantir que o ar externo não entre na área de trabalho; mostra que todo o ar admitido na cabine passa por baixo da mesa de trabalho e é recirculado/exaurido.
- Ensaio de integridade: verifica a integridade do equipamento e do filtro HEPA. É fundamental, pois é o único teste que realmente desafia o equipamento.

- Ensaio do nível de ruído: verifica o nível de ruído do equipamento, que deve ser igual ou inferior a 70 Dba, desde que o nível de ruído do ambiente seja menor que 57 Dba.
- Ensaio de luminosidade: verifica a intensidade de luz da área de trabalho, que deve ser de no mínimo 480 lux.
- Nota: a norma não exige o ensaio de contagem de partículas, porém, por uma característica tipicamente brasileira, em toda certificação de uma cabina de segurança é feito o ensaio.

De acordo com a NSF-49, todo equipamento de segurança biológica deve ser certificado pelo menos uma vez ao ano, ou quando o filtro HEPA for substituído e sempre que for movimentado. O fator determinante para definição da periodicidade da certificação depende do quanto é crítico o trabalho realizado no equipamento, por isso o gestor do laboratório de microbiologia pode definir períodos menores para que essa certificação ocorra.

PLANO DE MANUTENÇÃO PREVENTIVA DAS CABINES DE SEGURANÇA

Tarefas executadas pela equipe técnica do laboratório

- Manutenção diária:
 - Limpeza da cabine com água estéril e solução detergente antibacteriana em compressa estéril, seguida da desinfecção com álcool 70%.
 - Descontaminação: recomenda-se seguir a técnica de limpeza diária acrescida de um agente esporicida.
 - Verificação das lâmpadas ultravioleta.
 - Verificação dos filtros.
- Manutenção mensal:
 - Limpeza da lâmpada ultravioleta com pano umedecido com solução bactericida.
 - Registro do consumo e da utilização da lâmpada ultravioleta.

Tarefas executadas por empresa terceirizada devidamente habilitada

- Manutenção semestral:
 - Contagem eletrônica de partículas.
 - Medição e ajuste da velocidade do fluxo de ar.
 - Verificar o caminho do ar dentro da área de trabalho.
 - Medir o índice de saturação dos filtros absolutos.
 - Revisão do(s) selo(s) de vedação.

- Verificação do sistema eletromecânico.
- Medição da(s) corrente(s) elétrica(s) do(s) motor(es).
- Revisão do(s) manômetro(s).
- Verificar o nível de ruído do equipamento.
- Verificar a intensidade de luz da área de trabalho.
- Verificar a integridade do filtro HEPA.
- Verificar a integridade do equipamento.
- Manutenção anual:
 - Efetuar a troca de filtros.
 - Certificação da cabine de segurança.
- Cuidados com as estufas:
 - Condições de aceitação para uso do equipamento devem ser definidas pelo responsável.

PLANO DE MANUTENÇÃO PREVENTIVA DAS ESTUFAS DE CO₂

Tarefas executadas pela equipe técnica do laboratório

- Manutenção diária:
 - Verificação do manômetro do cilindro de CO₂.
 - Verificação do nível de CO₂ no cilindro.
 - Na data de troca do cilindro de CO₂, verificar os ajustes efetuados nos manômetros pelo técnico especializado.
 - Verificação de vazamentos de gás.
 - Verificação de sensores de nível de CO₂.
 - Verificação das luzes e sinais sonoros de alarme.
 - Controle de temperatura e umidade: 2 vezes/dia.
 - Verificação da chave liga/desliga.

PLANO DE MANUTENÇÃO PREVENTIVA DOS OUTROS TIPOS DE ESTUFAS

- Verificação do painel de controle eletrônico de temperatura.
- Verificação do termostato.
- Verificação do alarme: sinal sonoro ou luminoso.
- Controle de temperatura: medida de temperatura 2 vezes/dia, caso não haja registros contínuos automáticos.
- Verificar chave liga/desliga.

- Manutenção semanal:
 - Limpeza interna: limpar com esponja ou pano úmido com água e detergente neutro, seguindo-se de higienização com álcool 70%.
 - Limpeza externa: limpar com esponja ou pano úmido e detergente neutro.

Tarefas executadas por empresa terceirizada devidamente habilitada

- Manutenção semestral:
 - Verificação das borrachas de vedação.
 - Inspeção e testes com painel de controle eletrônico.
 - Verificação do termostato.
 - Verificação da lâmpada piloto.
 - Verificação dos sensores de temperatura.
 - Verificação da resistência.
 - Verificação das condições da tomada e do conector.
- Manutenção anual:
 - Verificação eletroeletrônica.
 - Troca de lâmpadas.
 - Troca de borrachas de vedação.
 - Calibração de termômetros.

GESTÃO DA AUTOMAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Desde a década de 1960, a automação vem sendo aplicada no laboratório de microbiologia clínica. A automação tem contribuído para a detecção dos agentes, sua identificação, testes de sensibilidade, detecção de positividade em hemoculturas, triagem para urinas com patógenos potenciais e avaliação do nível de agentes antimicrobianos em fluidos corpóreos.

A automação tem permitido realizar diagnósticos com maior eficiência que os testes microbiológicos manuais, trazendo também mais sensibilidade e especificidade. Isso sem enumerar o diagnóstico molecular com as modernas técnicas de sequenciamento, que têm contribuído na investigação de resistência bacteriana.

Recentemente, o uso da espectrometria de massas (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* – MALDI-TOF) na identificação de organismos está entre as mais modernas aplicações na microbiologia clínica.

Os desafios para a gestão dessas novas tecnologias é grande. A começar pela preparação de mão de obra para utilizá-las e realizar sua manutenção adequadamente. Ocorreram também mudanças na velocidade de emissão dos laudos e no conteúdo dos relatórios contendo resultados. A etapa de instalação

requer diferentes especialistas trabalhando conjuntamente para proporcionar as condições de infraestrutura requeridas para o bom funcionamento dessas tecnologias inovadoras.

O processo de validação desses equipamentos precisa ser cuidadoso. Os protocolos de aplicações devem ser metodicamente delineados, documentados e comunicados a todos os operadores e supervisores do laboratório.

O abastecimento e armazenamento de padrões, insumos, descartáveis, gases e controles requerem um planejamento diligente, por causa dos requisitos alfandegários existentes e do tipo de material a ser utilizado.

O estabelecimento de contratos de manutenções com fornecedores especializados amplia a segurança do bom funcionamento. As listas de verificações para manutenções periódicas devem obedecer às instruções dos fabricantes, tanto em atividades quanto na sua periodicidade. Os cuidados com peças de reposição periódica devem ser redobrados pelo gestor. Tudo isso se completa pelo monitoramento e pela análise do desempenho no dia a dia.

DISPOSIÇÃO FINAL DOS EQUIPAMENTOS

A desativação de um equipamento requer alguns cuidados prévios à sua disposição final, como: destinação da sua documentação; elaboração de um plano de descontaminação (p.ex., química, biológica, radiação); remoção de informações confidenciais, transferindo-as para uma mídia alternativa; e cuidados com as instalações e o meio ambiente. Um equipamento que foi disponibilizado pode seguir algumas alternativas:

- Substituição por outro modelo mais atual ou troca da tecnologia.
- Armazenamento para uso posterior ou visando a fornecer peças de reposição para outro similar ainda ativo.
- Venda.
- Doação a outro serviço, mediante entrega de certificado descrevendo as condições do equipamento.
- Entrega ao fabricante como parte do pagamento pela aquisição de um modelo mais atual.
- Destruição e sucateamento.

A disposição final dos equipamentos deve seguir a política definida pela instituição, cumprindo-se os requisitos legais. O gestor do laboratório de microbiologia é o responsável por cumprir as diretrizes institucionais em sua esfera de atuação.

MONITORAMENTO E INDICADORES DE DESEMPENHO

Uma das funções do gestor é monitorar o desempenho do processo sob a sua responsabilidade. Ao planejar o futuro da gestão de equipamentos no laboratório de microbiologia, os responsáveis delineiam os objetivos, os quais são desdobrados em metas e a cada uma delas corresponde pelo menos um indicador de desempenho, visando-se a uma administração pautada em fatos comprovados de maneira objetiva.

Para tanto, há exigência de registros corretos e atualizados das atividades realizadas, efetuados por equipe interna ou externa ao laboratório, o que produz segurança na informação compilada.

Um monitoramento adequado desse processo de medições é parametrizado detalhadamente: com dados de como se calcula o indicador, qual é a base de dados de consulta, quem responde pelas informações desse indicador, frequência de monitoramento, por que esse cálculo é realizado, como é divulgado, quem analisa esses resultados e para quem se entrega a análise.

Na gestão de equipamentos há alguns índices já consolidados na prática operacional, entre eles destacam-se: tempo médio entre falhas (MTBF), tempo médio para reparos (MTTR), produção média entre falhas, percentual de disponibilidade, monitoramento do número de manutenções corretivas efetuadas no período, percentual de pendências relativas à manutenção no período, taxa de cumprimento das ordens de serviço, custos envolvidos com manutenções, valor da hora técnica comparada entre diferentes oficinas, produtividade da mão de obra direta, percentual de tempo gasto com atividades de manutenção preventiva pela equipe técnica do laboratório, custos com estoque de peças e materiais para manutenção.

Para que essa análise fique completa, aplica-se a técnica de referenciação ou *benchmarking*, em que os resultados do laboratório são comparados com seus pares. Se, na comparação, os dados do seu laboratório estiverem piores que os resultados observados por serviços considerados como referência, novo ciclo do PDCA (*Plan – Do – Check – Act*) deve ser desencadeado em busca de melhoria contínua.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo envolve diferentes aspectos da gestão de equipamentos no laboratório de microbiologia, desde a seleção de uma nova tecnologia até a disposição final de um equipamento obsoleto ou sem condições de uso.

Nesse ciclo de vida do equipamento, foram considerados: planejamento, capacitação das pessoas envolvidas com as tecnologias em utilização, qualificação

de fornecedores, importância das validações de nova tecnologia ou metodologia, manutenção correta, aspectos metrológicos relevantes, harmonização entre sistemas analíticos similares, controle operacional cuidadoso, documentação, cuidados com a sustentabilidade e monitoramento por meio de indicadores específicos.

Para algumas famílias de equipamentos empregados no laboratório de microbiologia, são fornecidos roteiros de cuidados especiais a fim de os manter em boas condições e ampliar a sua vida média útil.

Um laboratório de microbiologia de excelência congrega as boas práticas de laboratório clínico com gestão adequada. Sendo o parque tecnológico um dos fulcros dos serviços laboratoriais, não se pode relegar sua administração a segundo plano. O bom gerenciamento dos equipamentos propicia produção com maior confiabilidade, níveis de produtividade planejados e efetividade nas ações.

BIBLIOGRAFIA

1. ANSI/ASHRAE Standard 110-1995 – Method of testing performance of laboratory fume hoods. Disponível em: http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2003/03artigoTecnico.pdf. Acessado em: 02 maio 2014.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR ISO 17665-1:2010 – Esterilização de produtos para saúde – vapor. NR-13 : Manual técnico de caldeiras e vasos de pressão. – Edição comemorativa 10 anos da NR-13. Brasília: MTE, SIT, DSST; 2006.124 p.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 5462 Confiabilidade e Manutenibilidade – Terminologia. Rio de Janeiro; 1994.
4. Branco Filho G. A Organização, o planejamento e o controle da manutenção. Rio de Janeiro: Ciência Moderna, 2008.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília: Anvisa, 2010.
6. Calil SJ, Teixeira MS. Gerenciamento de manutenção de equipamentos hospitalares. v. 11. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998.
7. Clinical and Laboratory Institute (CLSI). GP 17-A3 Clinical Laboratory Safety; Approved Guideline. 3.ed. CLSI document GP 17 – A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
8. Clinical and Laboratory Institute (CLSI). GP 31-A Laboratory Instrument Implementation, Verification, and Maintenance; Approved Guideline. 3.ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
9. Clinical and Laboratory Institute (CLSI). GP19-A2. Laboratory Instruments and Data Management Systems: Design of software user Interfaces and End user software systems validation, operation, an Monitoring. Approved Guideline. CLSI document GP19 (Eletronic). Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.

10. Clinical and Laboratory Institute (CLSI). QMS13-A – Quality Management System: Equipment; Approved Guideline. CLSI document QMS 13-A (Eletronic). Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Approved Guideline GP31-A: Volume 29 Number 11 – Laboratory Instrument Implementation, Verification, and Maintenance, Approved Guideline. 3.ed. Wayne: CLSI; 2009.
12. Cohen T. Benchmark indicators for medical equipment repair and maintenance. *Biomedical Instrumentation & Technology* 1995;308-21.
13. Couto RC et al. Infecção hospitalar e outras complicações não infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.216-41.
14. Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT). Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde. Informe Técnico. Avaliação de Tecnologias em Saúde: institucionalização das ações do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Pública* 2006;40(4):743-7.
15. Fernandes MA. Como aumentar a disponibilidade das máquinas e reduzir custos de manutenção. *Revista Máquinas e Metais* 2003;316-329.
16. Figueiredo L, Rodrigues MA. Cabinas de fluxo laminar x cabinas de segurança biológica. Disponível em: <http://www.veco.com.br/verartigo.php?codigo=12>. Acessado em: 02 maio 2014.
17. Galoro CAO et al. Applicability and potential benefits of benchmarking in Brazilian clinical laboratory services. *Benchmarking: An International Journal* 2009;16(6):817-30.
18. Graziano KU. Processos de limpeza, desinfecção e esterilização de artigos médico-hospitalares. In: Oliveira AC, Armond GA, Clemente WT. *Infecções hospitalares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.491-516.
19. Helmann KS, Marçal RFM. Método multicritério de apoio à decisão na gestão da manutenção: aplicação do método ELECTRE I na seleção de equipamentos críticos para processo. *Revista Gestão Industrial* 2007;3(1):123-33.
20. IEST – RP – 002.2. Unidirectional flow clean air devices. Rolling Meadows: Institute of Environmental Science and Technology, 1999.
21. Kardec A, Nascif J. *Manutenção função estratégica*. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2005.
22. Lewandroski K. Managing utilization of new diagnostic tests. *Clin Leadresh Manag Rev*, 2003;17(6):318-24e.
23. Lucatelli MV. Proposta de aplicação da manutenção centrada em confiabilidade em equipamentos médico – hospitalares. [tese] Florianópolis: Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
24. Mendes ME, Gartner MT, Sumita NM, Sánchez PB. *Gestão por processos no Laboratório Clínico. Uma abordagem prática*. São Paulo: EPR, 2007.
25. Mendes ME, Lavorato LMO, Novaes RCD, Abe NY, Sumita NM. Aplicação da manutenção produtiva total (TPM) na medicina laboratorial: a experiência da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. *Laes & Haes*, 2005;26/154:130-40.

26. Mendes ME, Romano P. Validação de sistema analítico. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios, 2010. p.39-62.
27. Mendes ME, Sumita NM. Controle de processo automatizado. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios, 2011. p.127-62.
28. Mendes ME, Sumita NM. Gestão de equipamentos. In: Mendes ME, Gartner MT, Sumita NM, Sanchez PB. Gestão por processos no laboratório clínico. Uma abordagem prática. Guarulhos: EPR, 2007.
29. Mendes ME, Sumita NM. Gestão estratégica de equipamentos na medicina laboratorial. J Bras Patol 2006;25:4-7.
30. Mendes ME, Sumita NM. Seleção e qualificação de sistema analítico. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios, 2010. p.15-38.
31. Mendes ME. Gerenciar equipamentos para reduzir prazos e custos. Boletim ControlLab Qualifique 2010;28(Jan/Fev/Mar).
32. Mussef IC, Oliveira AC. Central de material esterilizado (CME). In: Martins MA. Manual de infecção hospitalar. Rio de Janeiro: MEDSI, 2005. p.728-98.
33. NR 32 – Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde. Portaria GM n.º 485, de 11 de novembro de 2005.
34. NSF/ANSI 49-2011 Biosafety cabinetry: design, construction, performance, and field certification. Annex E. NSF International Standard American National Standard. Disponível em: http://www.nsf.org/newsroom_pdf/nsf_49-11_annex-e.pdf. Acessado em: 30 abr 2014.
35. Novaes HMD. Da produção à avaliação de tecnologias dos sistemas de saúde: desafios do século XXI. Rev Saúde Pública 2006;40(N Esp):133-40.
36. Oliveira CA, Mendes ME. Equivalência de sistema analítico. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios, 2010. p.63-94.
37. Organización Panamericana de la Salud. Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. Washington: OPS 2002. p.33.
38. Palady P. FMEA: análise dos modos de falhas e efeitos – prevendo a prevenindo problemas antes que ocorram. São Paulo: IMAM, 2007.
39. Righetti C, Vieira PCG. Autoclave: aspectos de estrutura, funcionamento e validação. RESCAL. São Paulo 2012;1(2):185-9.
40. Santos VDF et al. Limpeza e desinfecção da cabine de segurança biológica classe II B2: a realidade dos serviços de oncologia de Curitiba. Rev Bras Farm 2012;93(3):310-4.
41. Souza VC. Organização e gerência da manutenção. 2.ed. São Paulo: All Print, 2007.

14. Indicadores de qualidade em microbiologia clínica

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico proporcionou grande destaque nas questões da qualidade no último século. Com a Revolução Industrial, iniciada nos anos 1920, surgiu a inspeção, que tinha a finalidade de avaliar o produto final e separar aqueles que apresentavam defeitos, evitando, assim, sua comercialização. A inspeção constituiu-se, portanto, na primeira fase de evolução da qualidade e a criação do departamento de engenharia de produção nas indústrias. Ferramentas estatísticas, com o propósito de medir, avaliar e controlar a qualidade, são usados com essa finalidade. Em 1931, W. Shewart publicou *Economic control of quality manufactured product*, embasando esses conceitos cientificamente. Surgiu, em seguida, a preocupação com a qualidade em todos os processos de produção, admitindo-se que o grau de variabilidade da produção em relação a matérias-primas, máquinas utilizadas e operador teria importância capital na qualidade do produto fabricado. Tem-se, então, o início do controle estatístico do processo por amostragem, com técnicas que estabeleciam o limite de variação aceitável durante todo o processo, não se restringindo apenas ao produto final. Nos anos 1940, o controle da qualidade tornou-se disciplina acadêmica nos cursos de engenharia.

Em 1950, W. Edwards Deming criou um novo conceito no gerenciamento em qualidade, denominado ciclo do PDCA, cujas iniciais em inglês significam: planejar, fazer, controlar e agir corretivamente. Em seguida, Joseph M. Juran publicou a obra *Quality Control Handbook* e, em seu conteúdo, aborda os custos da qualidade, de modo que os termos “custo da não qualidade” e “retrabalho” são abordados. Em 1956, A. Feigenbaum propôs o conceito de qualidade total,

preconizando que a qualidade do produto é de toda a organização, e não se restringe somente ao departamento de controle de qualidade. Deming, em dois dos seus conhecidos 14 pontos do gerenciamento com qualidade, sugeriu criar uma constância de propósitos na busca do aperfeiçoamento de bens e serviços, uma vez que oferecer bens e serviços com qualidade é uma obrigação daquele que o produz, para atender às necessidades dos usuários, já que estamos em uma nova era econômica e o mundo ocidental deve despertar para esses desafios e aprender suas responsabilidades para adotar atitudes que liderem as mudanças. Por sua vez, os compradores de bens ou serviços requerem, de maneira cada vez mais exigente, o melhor desempenho dos produtos que adquirem ou utilizam. A produção de produtos e serviços com qualidade é uma obrigação daquele que fabrica ou presta serviços para com seus usuários, de modo que um número maior de clientes tenha acesso a bens e serviços que possam satisfazer suas necessidades.

Tem-se observado, desde então, um significativo número de organizações produzindo importantes movimentos para promover o desenvolvimento das empresas nos modelos de organização gerencial e padronização de seus processos. Entre essas organizações, a International Organization for Standardization (ISO) tem se destacado como uma das mais importantes, tendo adquirido relevado reconhecimento mundial e cada vez é maior o número de empresas que se organizam, desenvolvem e certificam seus programas da qualidade com base nos padrões ISO. No Brasil, as boas práticas de laboratórios clínicos (BPLC) são o conjunto mais importante de normas brasileiras que definem a padronização dos processos no laboratório clínico, além da RDC 302, que trouxe importantes contribuições para a normatização dos procedimentos nos laboratórios clínicos do Brasil.

Sociedades de especialidades também têm contribuído para o crescimento das ações nos laboratórios, estimulando práticas para a garantia da qualidade dentro de critérios que atendam à ISO 15183. A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica tem implementado esforços desde 1998 com o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC), com o propósito de estimular as boas práticas dentro da patologia clínica nos laboratórios. A norma PALC, na versão 2010, incluiu itens relacionados à gestão de riscos e à segurança dos pacientes, que teve grande impulso em 2001 nos Estados Unidos com a publicação do documento “Errar é Humano”, que faz um alerta para o caráter epidêmico dos eventos adversos observados no setor de saúde. As boas práticas auxiliam na prevenção dos erros, no entanto, é necessário medi-los e, a partir dessas medidas, estabelecer

as ações corretivas necessárias. Dessa maneira, é importante a introdução dos indicadores da qualidade em todas as fases do processo analítico.

INDICADORES DA QUALIDADE

A quantificação das falhas nos diferentes processos laboratoriais com o objetivo de implantação e implementação de medidas corretivas somente pode ser realizada por meio da análise e do acompanhamento de indicadores nos diferentes processos do laboratório. Esse processo é realizado visando-se a melhoria contínua.

Uma adequada gestão desses indicadores exige a implantação de ferramentas para que se possa medir, acompanhar e corrigir as falhas no processo, garantindo, dessa forma, a eficácia desse processo no laboratório, seja na fase pré-analítica, analítica ou pós-analítica.

Os indicadores permitem comparações internas e externas com outros serviços por meio da prática de *benchmarking*, o que também é possível pela participação no Programa de Indicadores da ControlLab, que possibilita, pela análise dos dados, comparações dos resultados dos processos com outros serviços com as mesmas características.

A normativa internacional para acreditação de laboratórios clínicos – ISO 15189:2012 – sugere que os indicadores da qualidade podem mensurar a qualidade dos processos operacionais e quanto os laboratórios atendem aos requisitos dos usuários. Ela recomenda o monitoramento periódico, sobretudo no que se refere aos aspectos críticos do processo laboratorial. A utilização de indicadores pode ajudar no julgamento, na definição das prioridades e na avaliação da efetividade das intervenções implantadas e possibilita também comparações de desempenho entre diferentes prestadores de serviços de saúde.

No Brasil, a Agência Nacional de Saúde (ANS) está trabalhando para definir indicadores que possam orientar os usuários do sistema de saúde suplementar na escolha dos prestadores de serviço. No setor de laboratório, no entanto, existem ainda diferenças, não havendo orientação formalizada quanto a sua utilização e nem em relação a uma terminologia comum, forma de medidas, unidades, etc.

Conhecem-se várias iniciativas com o objetivo de se obter uma harmonização e padronização das práticas e dos métodos em medicina sem, no entanto, haver ainda um consenso universal sobre os indicadores na área da medicina laboratorial.

A “padronização” refere-se à conformidade com um padrão preestabelecido e aceito. A “harmonização”, por sua vez, é resultado de um acordo consensual que se estabelece na falta desse padrão. Ele representa uma maneira de conversão de resultados, de modo que possam ser utilizados de forma intercambiável.

Em outubro de 2013, um grupo de profissionais de laboratório, sob a liderança de Mario Plebani, realizou em Padova, Itália, uma conferência de consenso sobre indicadores de qualidade que reuniu profissionais de diversos países, incluindo o Brasil, com a finalidade de harmonizar os indicadores aplicáveis na área de medicina laboratorial. O trabalho, ainda não totalmente concluído, destacou alguns pontos importantes:

- Foco no paciente com o propósito de promover qualidade e segurança.
- Consistência com a definição de erro laboratorial, segundo a ISO 22367:2008, e abrangência do processo laboratorial total (*total testing process* – TTP), desde a solicitação do exame, identificação das amostras na fase pré-analítica, até a comunicação de resultados e sua correta interpretação e utilização.
- Consistência com requisitos da norma internacional ISO 15189:2012.

Nessa reunião, definiram-se ainda os pré-requisitos importantes:

1. Importância e aplicabilidade para amplo espectro de laboratórios clínicos em nível internacional.
2. Base científica com foco em áreas de importância para análises clínicas.
3. Definição de metas de desempenho, baseada em evidências.
4. Utilização oportuna e possível como medida de melhoria contínua.

Além de indicadores de processos operacionais, foram também discutidos os indicadores de processos de suporte e de resultado.

Definiram-se, em um primeiro momento, 34 indicadores pré-analíticos, 7 indicadores analíticos e 13 pós-analíticos.

INDICADORES DA QUALIDADE EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

O item 2 – Gestão do Sistema da Qualidade da Norma PALC, subitem 2.4, estabelece que

a Direção do Laboratório ou seu responsável técnico deve definir e implementar indicadores para avaliar e monitorar sistematicamente a contribuição do laboratório para a qualidade global da assistência médica, quando aplicável, e referentes a aspectos críticos para a qualidade dos serviços laboratoriais prestados em todas as suas fases.

Os indicadores são medidas para avaliar o controle de processos e sistemas, serviços ou produtos com o propósito de se conhecer se atendem um desempenho esperado ou meta estabelecida para aqueles indicadores e, quando possível, comparar por meio da prática de *benchmarking* com processos semelhantes de outras instituições. As principais características de um indicador devem ser:

- Representatividade: representar o processo e demonstrá-lo de forma clara.
- Simplicidade: deve ser de fácil obtenção e ter baixo custo.
- Disponibilidade: além do seu acesso fácil, deve também estar disponível a tempo.
- Estabilidade: permitir a análise histórica e sua evolução.
- Rastreabilidade: ser possível verificar a origem dos dados que o gerou.
- Adaptabilidade: ter capacidade de respostas às mudanças.

Desse modo, um indicador deve conter nome, período de coleta dos dados, periodicidade, metodologia dos cálculos de sua apuração, unidade de medida, forma de interpretação e intervenções necessárias na busca da melhoria.

Os indicadores podem ser classificados em estratégicos, de eficiência (produtividade), qualidade (eficácia), efetividade e capacidade. Também devem satisfazer interesses das partes relacionadas (*stakeholders*) do negócio, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Exemplos de partes relacionadas em um negócio (stakeholders) e os respectivos interesses

| Clientes | Colaboradores | Acionistas | Fornecedores | Comunidade |
|--------------|---------------|----------------|--------------|----------------|
| Preço | Higiene e | Dividendos | Parceria | Preservação do |
| Qualidade | segurança | Valorização do | Aumento de | meio ambiente |
| Variedade de | Salários | patrimônio | vendas | Recolhimento |
| produtos | Crescimento | | | de impostos |
| Rapidez na | peçoal e | | | |
| entrega | profissional | | | |
| Cumprimento | Respeito | | | |
| de prazo de | | | | |
| entrega | | | | |
| Inovação de | | | | |
| produtos | | | | |

Fonte: adaptada de Martins e Costa Neto, 1998.

Na microbiologia clínica, podem-se ter indicadores nas três fases do processo, ou seja, pré-analítica, analítica e pós-analítica. Podem-se seguir exemplos citados por Galoro no livro *Qualidade em Laboratório Clínico: 156 perguntas e respostas* adaptadas para este livro e transcritas na Tabela 2.

Tabela 2 Exemplos de indicadores de processos nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica em microbiologia

| Fase do processo na microbiologia | Indicadores |
|-----------------------------------|---|
| Fase pré-analítica | Recoleta Erros na abertura de cadastro Amostras solicitadas e não coletadas Falhas na coleta do material microbiológico Problemas no transporte da amostra microbiológica |
| Fase analítica | Percentual de resultados inaceitáveis no CIQ Percentual de resultados inaceitáveis no AEQ |
| Fase pós-analítica | Sucesso na comunicação de valores críticos Percentual de resultados liberados no prazo Intercorrências na liberação de resultados Exames liberados e não solicitados Exames solicitados e não liberados Percentual de laudos retificados |

CIQ: controle interno da qualidade; AEQ: avaliação externa da qualidade.

Fonte: adaptada de Galoro.

Outros indicadores, dependendo do serviço e avaliação das necessidades, podem ser incluídos, como contaminação de hemoculturas, índice de solicitação de nova coleta, índice de rejeição de amostras, erros na informação da amostra, percentual de laudos corrigidos, percentual de lâminas para bacterioscopia revisadas pós-cultura, entre outros. Deve-se lembrar, no entanto, que a boa gestão de indicadores não determina um grande número de indicadores. Eles devem ser representativos do processo e, sobretudo, permitir a tomada de decisão.

Quanto à periodicidade, devem ser analisados em função da criticidade dos processos a que estão relacionados, do desempenho atual e da necessidade do laboratório de microbiologia na melhoria contínua de seus processos. Essa decisão requer, portanto, análise prévia para se conhecer o *status quo* e, poste-

riormente, estabelecer os indicadores que serão implantados e implementados e a periodicidade da medida desses indicadores, que pode ser mensal, trimestral, semestral ou anual, e está vinculada à informação obtida na análise crítica inicial do processo na microbiologia.

O erro no laboratório clínico, segundo a ABNT AMN ISO/TS 22367:2009, representa falha de uma ação planejada que não se completou como foi proposta, ou o uso de um plano incorreto para alcançar uma meta, que pode ocorrer em qualquer parte do ciclo do laboratório, desde o pedido da análise até o laudo de resultados, sua interpretação e a reação aos erros. Assim, pode-se concluir que os erros possíveis nas diversas fases do laboratório podem ser quantificados e avaliados por meio de indicadores. Além disso, pode-se avaliar, por intermédio dos resultados obtidos, a possibilidade dessas falhas de causar risco adverso ao paciente. O item 17 – Gestão dos Riscos e da Segurança do Paciente, subitem 17.3, determina: “O Sistema de Gestão da Qualidade do laboratório clínico deve propiciar”:

- a. A identificação, a análise e a avaliação dos perigos e riscos existentes, incluindo aqueles que impactam na segurança do paciente.
- b. A monitoração da ocorrência de erros, falhas, eventos adversos (incluindo os do tipo *near miss*) e sentinela, acidente e incidente*.
- c. A definição de ações de contenção e minimização dos riscos.
- d. A monitoração dos erros, falhas, acidentes e eventos adversos por meio de indicadores.
- e. A avaliação qualitativa ou quantitativa da efetividade da gestão do risco.

Além disso, o sistema de gestão da qualidade deve avaliar e categorizar os riscos pela análise crítica dos resultados com o uso de ferramentas que permitam essas avaliações, como as ferramentas Failure Reporting And Corrective Acton System (FRACAS) e Failure Mode and Effects Analysis (FMEA), por exemplo. Caso deseje se aprofundar na gestão de riscos e na utilização dessas ferramentas, o leitor pode consultar a publicação “Gestão da Fase Pré-analítica: Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica”.

Implantar e implementar indicadores da qualidade no laboratório clínico ainda é um grande desafio para os gestores, considerando-se a necessidade

* *Near miss* é um termo usado na literatura internacional para designar o erro que não causa dano, ou seja, o erro que efetivamente ocorreu, mas que não afetou negativamente o paciente.

de ampliar conhecimentos nessa área, as definições e harmonização dos indicadores e as metas a serem alcançadas, além da necessidade da implantação da cultura na medição de indicadores como uma ferramenta para a melhoria contínua na gestão dos processos no laboratório.

BIBLIOGRAFIA

Referências normativas brasileiras consultadas

1. Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos, Norma PALC. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. 2013.
2. Gestão da Fase Pré-analítica. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Gestão da Fase Pré-Analítica. Grafitto; 2010. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br>.

Referência normativa internacional consultada

1. NCCLS/CLSI. Development and use of quality indicators for process improvement and monitoring of laboratory quality; Approved Guideline. 3rd ed. NCCLS/CLSI document QMS12A Formely GP35-A. Wayne. 2010;30(24-A3).

LEITURAS RECOMENDADAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica – Módulo II. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em: 27 abr 2014.
2. Barth J. Clinical quality indicators in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem* 2012;49:9-16.
3. Furtado K et al. *J Bras Patol Med Lab* 2011;47(3):201-10.
4. Galoro A. Qualidade em laboratório clínico – Coleção 156 perguntas e respostas. São Paulo: Sarvier, 2012.
5. Olímpio J, Nogueira V. Indicadores de qualidade e quantidade em Saúde. *RAS* 2001;3(12).
6. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44(6):750-9.
7. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: the complete picture. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(4):741-51.
8. Programa de Indicadores Laboratoriais SBPC/ML-ControlLab. Disponível em: <http://www.controllab.com.br/?gclid=CICl-pDfirsCFYVZ7AodGykADg>. Acessado em: 27 abr 2014.
9. Shahangian S, Snyder SR. Laboratory medicine quality indicators: a review of the literature. *Am J Clin Pathol* 2009;131:418-31.
10. Shcolnik W et al. Brazilian laboratory indicators program. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(11):1923-34.

Índice remissivo

A

- ABNT 2, 241
- abscessos 78, 115
 - cavitários 78
- acidente 34, 35
- aerossóis 21
- Agência Nacional
 - de Saúde 257
 - de Vigilância Sanitária 3
- agentes biológicos 22
- álcool a 70% 55, 89
- alvará 3
- ambiente de apoio 8
- amostra(s)
 - broncoalveolares 77
 - contaminadas 21
 - cutâneas 89
 - de sangue pareado 83
- amplificação 154
- anaeróbios 162
- análise crítica 137, 143
- anotação de responsabilidade técnica (ART) 6
- ANS 257
- anthrax* 171
- antibiograma 123, 124
- anticoagulante(s) 57, 62
- antisepsia 55
- Anvisa 21, 121
- apoio ao diagnóstico e terapia 8
- área física 1
- armazenamento de amostras 33
- arquitetura 9
- artrite 65
- ascite 63
- aspirado
 - de medula óssea 90
 - traqueal 77
- ATCC 132, 206
- autoclaves 134, 241
- automação 179
 - em microbiologia 249
- avaliação
 - de desempenho 224
 - externa da qualidade 260

B

BAAR 117
bacilos
 álcool-ácido-resistentes 117
 Gram-negativos 161
 Gram-positivos 162
bacteriologia
 ambulatorial 145
 hospitalar 146
bacterioscopia 133
bacteriúria 47
benchmarking 257
biologia molecular 153
biópsias 115
biossegurança 12, 14, 25, 35, 89
boas práticas
 de laboratórios clínicos 256
 em laboratório clínico 24
box de coleta 8
BPLC 256

C

cabine
 de segurança 242
 biológica 29
calibrações 237
candida 98
candidemia 101
candidíase
 oral 99
 vaginal 100
capacitação 239
carbapenêmicos 198
cateter 41
cepas padrão 132

certificação 18, 246
cérvix uterino 79
CIM 124
citocentrífuga 106
classificação dos resíduos 31, 32
climatização 16
clorexidina 43
coaching 224
Cocos Gram-positivos 161
coleta 53
 de hemocultura 102
 de urina 40
coloração 188
competências 219
concordância 206
conhecimento 215
Conselho Regional de Engenharia e
 Agronomia (CREA) 6
contaminação 40
controle(s)
 alternativos 150
 de infecção 9
 interno da qualidade 131, 260
ControlLab 140
critérios
 de aceitabilidade 93, 105
 da amostra 57, 84
 de rejeição 45, 112
 da amostra 84
cultura
 anaeróbia 108
 de fungos 87, 89, 93, 94
 de liquor 105
 de urina 46
 geral 106
 para *Candida* 97
 para micobactérias 109

custo-efetividade 231

D

desenvolvimento 213, 223

das competências 225

diagnóstico laboratorial 73

diretoria colegiada 3

diretrizes 2

discos 126

de antibióticos 134

DNA 153

doenças

causadas por

bactérias 175

fungos 175

parasitas 175

príons 175

vírus 175

infecciosas emergentes 174

Downflow 245

E

EAS 7

educação continuada 239

eletroferogramas 154

ensaio(s) de proficiência 137, 138

enterobactérias 198

equipamento(s)

de proteção

coletiva 22

individual 22, 28

erro no laboratório clínico 261

ESBL 190

escarro 76, 90, 110

induzido 77

escopo do laboratório 2

esgoto sanitário 16

espectrometria de massa 159

esperma 81

estabelecimentos assistenciais de saúde 5

estufa 58

de CO₂ 248

exsudato(s) 61, 90

F

fase

analítica 72, 137, 260

pós-analítica 72, 260

pré-analítica 40, 53, 71, 72, 105, 181, 260

fatores de risco 97

febre purpúrica brasileira 172

feridas 78

fezes 90

filtro HEPA 244

fitas de gradiente e cartões de sistemas

automatizados 126

fluido intraocular 92

fluxo laminar 242

fragmentos de ósseos 115

frasco(s) de hemocultura 56, 58, 68

fungos 194

filamentosos 163

G

gânglios 115

gás combustível 17

GenBank 155

genes de resistência 156

gestão
 de equipamentos 229
 do conhecimento 216, 218, 220
glândula de Bartolin 79

H

habilidades 217
habilitação 17
Haemophilus
 influenzae 108
 spp 194
hemocultura(s) 53, 54, 185, 187
 pareada 211
higienização 41
hipoclorito de sódio 34
HIV 109, 173
HLAR 190

I

identificação bacteriana 209
incêndio 17
indicadores
 biológicos 33
 da(e) qualidade 255, 257
 de desempenho 251
infecção(ões)
 cutânea 98
 do trato urinário 39, 101
 emergentes 171, 175
 relacionada ao cateter 82
Inflow 245
infraestrutura 26
Inmetro 237
inoculadoras automatizadas 183

insumos 131
International Organization for Standard-
 ization 256
interpretação da urocultura 48
iodo 1% 62
iodopovidona 62
ISO 2, 256
 15189:2012 257
ISO/IEC 17043:2010 140
ITU 39, 50
IUPAC 141

L

laboratório de micobactérias 10
lâmpada de Wood 89
lavado
 broncoalveolar 112
 gástrico 113
legislação 1
lesão(ões)
 aberta 78
 genital 82
 superficiais 98
leucocitúria 50
leveduras 163
líquido(s)
 cavitários 61, 68, 114
 de diálise peritoneal 66
 pericárdico 64
 peritoneal 62
 pleural 61, 90
 sinovial 65
liquor 91, 113
luz ultravioleta 29

M

major error 207
MALDI-TOF 159, 181
manual de
 biossegurança 23
 coleta de amostras 58
 segurança biológica 11
manutenção preventiva 247
meios de cultura 132
metodologia de Gram 188
micobactérias 64, 107, 162, 188
micologia clínica 87
micoses 87
minor error 208
MRSA 190
MTBF 251
MTTR 251
Mueller Hinton 124, 126
Mycobacterium tuberculosis 13

N

Neisseria spp 194
nível de risco 36
norma(s)
 reguladora 32 24
 regulamentadora 2
 técnica 2
 tecnologias 230
NR 32 24
número de frascos 54

O

operação dos equipamentos 235

P

PALC 226, 256
PBA 6
período de incubação 127
peritonite 63, 67
planejamento 230
plano
 de ação 137, 148
 de manutenção preventiva 235
 de treinamento 239
PNCQ 140
polianetol sulfonato de sódio 62
ponta
 de(o) cateter 83, 91
POP 131
portaria 2
precisão 206
procedimento operacional padronizado
 131
processo(s)
 analítico(s) 137, 138, 143
 pós-analítico 137
 pré-analítico 137
Programa de Acreditação de Laboratórios
 Clínicos 256
projeto
 básico de arquitetura (PBA) 5
 de construção 12
 executivo 15
prontuário dos equipamentos 235
proteínas 61
 ribossomais 160
punção suprapúbica 42

Q

qualificações 217

R

raspado de córnea 92
RDC 1, 7, 8, 31, 57, 138
50 26
302 222
RDC/Anvisa 2, 4
refrigeração 43
resíduos 31
resistência 198
responsável técnico 12
risco 10
rol de equipamentos 233
rotinas em microbiologia 39

S

saco coletor 42
sala para coleta de material 8
sangue 90
SARS 171
secreção
conjuntival 92
de abscessos 91
de nasofaringe 75
de orofaringe 75
de seios nasais 76
nasal 76
prostática 81
purulentas 90, 115
traqueal 112
uretral 80
vaginal 80

segurança elétrica 240
sequenciamento 153
severe acute respiratory syndrome 171
sistema
automatizado 181
de hemoculturas 210
para hemocultivos 186
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial 140
sondagem vesical 42, 101
Staphylococcus 199
Streptococcus pneumoniae 108
suspensão bacteriana 127
swab 75

T

tecidos 91
tempo
de incubação 47
médio
entre falhas 251
para reparos 251
terapias imunossupressoras 97
teste
de difusão em ágar 124
de sensibilidade 205
aos antimicrobianos 182
transporte 43, 56
das amostras 34
trato genital 79
treinamento 213, 223
trompa de Falópio 79
TSA 123, 182
tuberculose 36, 109, 172

U

urina 91, 114
 pós-massagem prostática 81
 tipo I 44
urocultura 39, 45

V

validação 205
 de equipamentos 232
 do antibiograma 128

verificação(ões) 205, 237

volume 46

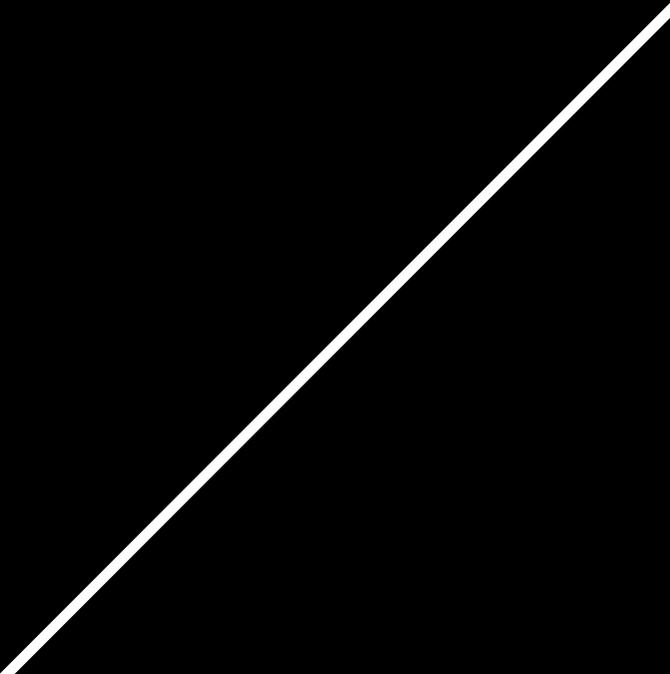
VRE 190

Z

Ziehl Neelsen 107, 118



MINIATLAS COLORIDO



A FIGURA ABAIXO CORRESPONDE À TABELA 8 DO CAPÍTULO 2 – BIOSSEGURANÇA NO FORMATO COLORIDO

Tabela 8 Resumo da classificação dos resíduos que podem ser gerados no laboratório de microbiologia segundo a RDC n. 306/2004

| Grupo | Simbologia | Característica | Subgrupo | Descrição resumida com foco na microbiologia |
|-------|---|---|----------|---|
| A |  | Presença de possíveis agentes biológicos que podem apresentar risco de infecção | A1 | Micro-organismos em culturas, instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; produtos utilizados na atenção de pacientes; sobras de material biológico enviados ao laboratório para análise |
| | | | A4 | Sobras de amostras de laboratório (fezes, urina e secreções) de pacientes sem agentes classe de risco 4; peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de confirmação diagnóstica |
| | | | A5 | Órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos, com suspeita ou certeza de contaminação com príons |
| B |  | Químicos que apresentam risco a saúde ou ao meio ambiente | | Produtos classificados como corrosivos, tóxicos inflamáveis e reativos |

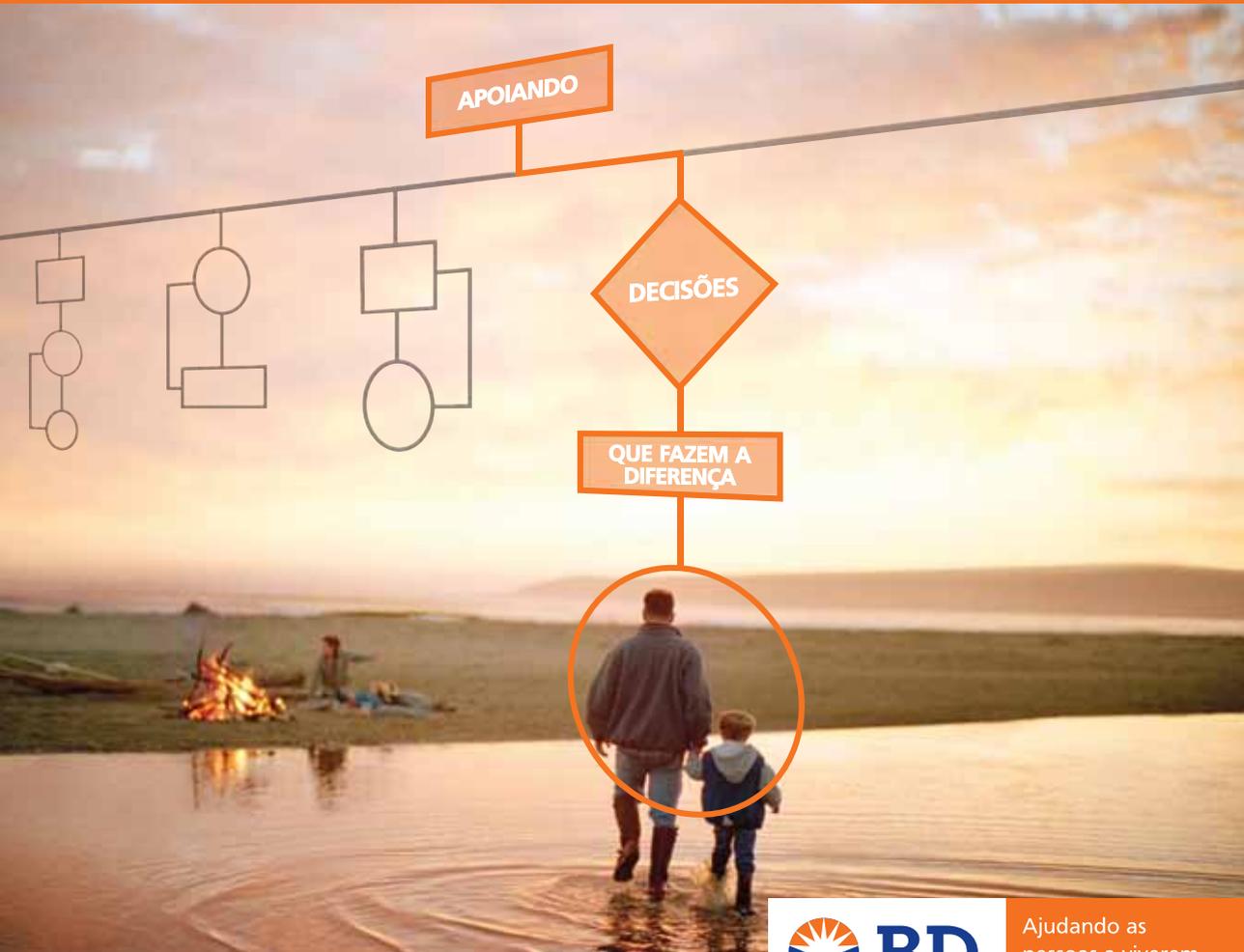
(continua)

Tabela 8 Resumo da classificação dos resíduos que podem ser gerados no laboratório de microbiologia segundo a RDC n. 306/2004 (*continuação*)

| Grupo | Simbologia | Característica | Descrição resumida com foco na microbiologia |
|-------|---|----------------------------|---|
| C |  | Rejeitos radioativos | Qualquer material resultante do uso de radionucleotídeos em quantidades superiores aos limites previstos pelo CNEN para reutilização ou descarte comum |
| D |  | Comum | Papel de sanitário, fraldas, absorventes higiênicos, resto de alimentos de pacientes, material utilizado na anti-sepsia; resíduos do administrativo; resíduos da área de construção. Neste grupo estão localizados os materiais que podem ser reciclados (vidro, papel, metal e plástico) |
| E |  | Materiais perfurocortantes | Lâminas de barbear, agulhas, lâminas de bisturi, ampolas de vidro, lancetas, vidros de laboratório quebrados, micropipetas entre outros |

BD BACTEC™

Solução para Hemocultura



Ajudando as
pessoas a viverem
vidas saudáveis



Aumento da recuperação
de microrganismos

Ampla neutralização
de antibióticos

Menor tempo
de detecção



Ampla neutralização de antibióticos



Aumento da recuperação de microrganismos



Menor tempo de detecção

BD Diagnostics

Diagnostic Systems
Rua Alexandre Dumas, 1976
São Paulo - SP - 04717-004
0800 771 7157
www.bd.com.br

BD Phoenix™ e MALDI Biotyper

Solução para Identificação e Teste de Sensibilidade



Ajudando as
pessoas a viverem
vidas saudáveis

- Resultados rápidos
- MIC Verdadeira
- Painéis estendidos ▶

| |
|---|
| Mais diluições Maior quantidade de antimicrobianos |
|---|
- Detecção de resistência emergente
- Integração e Monitoramento via BD EpiCenter™

BD Diagnostics
Diagnostic Systems
Rua Alexandre Dumas, 1976
São Paulo - SP - 04717-004
0800 771 7157
www.bd.com.br

BD MGIT™

Solução Completa para Micobactérias



Ajudando as
pessoas a viverem
vidas saudáveis

- **Cultura em Meio Líquido: Padrão Ouro**
- **Resultados Rápidos**
- **Teste de sensibilidade às drogas de tratamento de primeira e segunda linha**
- **Diminuição do Fluxo de Trabalho**

BD Diagnostics

Diagnostic Systems
Rua Alexandre Dumas, 1976
São Paulo - SP - 04717-004
0800 771 7157
www.bd.com.br

BD MAX™

Solução para Biologia Molecular



Ajudando as
pessoas a viverem
vidas saudáveis

Flexibilidade, rapidez e segurança

- Automação completa para o diagnóstico molecular de patógenos bacterianos, virais e parasitários
- Extração de ácidos nucleicos e PCR em tempo real em um único sistema
- Software aberto para desenvolvimento de novos testes
- Painéis prontos para o sistema fechado:
 - Bactérias entéricas
 - HAI (infecções relacionadas à assistência à saúde)
 - GBS (Estreptococos do grupo B)



BD Diagnostics

Diagnostic Systems
Rua Alexandre Dumas, 1976
São Paulo - SP - 04717-004
0800 771 7157
www.bd.com.br

BD

Soluções Integradas em Microbiologia



Ajudando as
pessoas a viverem
vidas saudáveis



INTEGRAÇÃO TOTAL DA MICROBIOLOGIA

- **Identificação de microrganismos:** MALDI Biotyper, BD Phoenix™ e/ou BD Crystal™
- **Teste de sensibilidade:** BD Phoenix™ e/ou BD Sensi-Disc™
- **Hemocultura:** BD BACTEC™
- **Biologia Molecular:** BD MAX™
- **Tuberculose:** BD BACTEC™ MGIT™
- **Integração e Monitoramento:** BD EpiCenter™

Porque em Microbiologia, cada minuto faz a diferença!

BD Diagnostics
Diagnostic Systems
Rua Alexandre Dumas, 1976
São Paulo - SP - 04717-004
0800 771 7157
www.bd.com.br

PIONEERING DIAGNOSTICS

TRANSFORMANDO PARCERIAS
EM INOVAÇÕES





NOSSO OBJETIVO É FORNECER RESULTADOS RÁPIDOS E CONFIÁVEIS PARA UMA MELHOR GESTÃO DO PACIENTE.

Com soluções de desempenho da bioMérieux, trabalhamos com você para garantir que seu laboratório faça uso inteligente de todos os seus recursos: tecnologia, equipamentos, conhecimento e habilidades.



No Gerenciamento da Sepse as primeiras 24 horas são decisivas!

A detecção precoce da Sepse e a rápida intervenção clínica tem se mostrado fundamental para boa evolução de pacientes com Sepse. No entanto, a Sepse pode ser difícil de ser distinguida de outras condições não infecciosas em pacientes criticamente doentes, com sinais clínicos de inflamação aguda e resultados de testes microbiológicos negativos. Por esta razão, na fase inicial da doença, pode ser complexo decidir sobre as medidas terapêuticas mais adequadas ao paciente. Toda informação adicional e específica é útil para aumentar a precisão do diagnóstico da Sepse nos estágios iniciais da doença.

VIDAS® BRAHMS PROCALCITONINA® (PCT): A introdução desse parâmetro no sistema VIDAS® representou um avanço para melhorar a gestão da Sepse. A progressão de uma infecção bacteriana grave está relacionada com a rapidez que o tratamento adequado é iniciado, quando comparado com a medição dos níveis de PCT. A Procalcitonina é uma ferramenta extremamente valiosa em unidades de terapia intensiva (UTI), onde a Sepse é uma das principais preocupações de Saúde Pública e causas de morte. Uma grande vantagem no uso da PCT, em comparação com outros parâmetros disponíveis para o diagnóstico da Sepse, é a sua elevação precoce e altamente específica em resposta a essa doença.

Na Sepse o aumento dos níveis de PCT pode ser observado de 3 à 6 horas após o início da infecção. Em infecções virais, doenças inflamatórias, doenças crônicas ou processos auto-imunes, os níveis da PCT são baixos permitindo, assim, o diagnóstico diferencial entre a Sepse e as diversas condições clínicas. O teste para detectar a Procalcitonina no Sistema VIDAS® é realizado em apenas 20 minutos, sendo possível obter os primeiros resultados que são decisivos para que o paciente com Sepse receba o tratamento adequado nesse curto período de tempo. A PCT contribui para a melhoria do gerenciamento do paciente e aumentando a sua chance de sobrevivência. O mesmo parâmetro também é utilizado para monitorar a terapia antimicrobiana e a resposta do paciente ao tratamento.

A Solução Completa que ajuda a salvar vidas: O laboratório de Microbiologia é parte integral e indispensável no Gerenciamento da Sepse para entregar resultados com alto valor clínico, de qualidade e no menor tempo possível para que o médico faça a opção do tratamento adequado, melhorando a saúde do paciente. A bioMérieux Brasil é a primeira empresa a oferecer para o mercado de diagnóstico in vitro a tecnologia inovadora de MALDI-TOF (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz) no sistema VITEK MS® que, em conjunto com o sistema VITEK®2 e a tira gradiente Etest®, oferecem a melhor e mais completa solução para identificação de microrganismos e antibiograma de fungos e bactérias.

Tira gradiente Etest®: Quando se trata do antibiograma de microrganismos que são raros ou difíceis de cultivar em cultura, com a tira gradiente Etest®, torna-se possível determinar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antibiótico, antifúngico e agentes anti-micobacterianos. Dependendo dos resultados desses testes, os médicos que tratam os pacientes com antibióticos de largo espectro podem ajustar o tratamento reduzindo o risco de toxicidade e de resistência aos antibióticos.

Hemocultura automatizada: O sistema BacT / ALERT® 3D permite o rápido crescimento e a detecção de bactérias ou leveduras responsáveis pela Sepse, sendo o único que possui frascos plásticos para hemocultura, garantindo maior segurança aos seus usuários.

bioMérieux: Um Passo a Frente no Gerenciamento da Sepse



**A microbiologia
SALVANDO VIDAS**

PIONEERING DIAGNOSTICS

DESENVOLVENDO A SAÚDE
PÚBLICA ALÉM DAS FRONTEIRAS



AS PRIMEIRAS 24 HORAS SÃO DECISIVAS



A melhor e mais completa solução para identificação e antibiograma



BIOMÉRIEUX BRASIL S/A

Informações 0800 026 48 48 • brasil.contato@sa.biomerieux.com • www.biomerieux.com.br

ALTA PERFORMANCE

para todas as áreas do seu Laboratório



PRÉ-ANALÍTICO

ANALÍTICO

CONTROLE

ATCC Licensed Derivative

PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

WASP

IDENTIFICAÇÃO

BIOLOGIA MOLECULAR





clínica



análise de água



indústria de alimentos



indústria farmacêutica



indústria cosmética



análise gestacional

MEIOS DE CULTURA

para o segmento Diagnóstico e para a Indústria



Os meios de cultura prontos para uso da Plast Labor são produzidos com matérias-primas de alto padrão de qualidade propiciando uma excelente performance do produto acabado. Todos os lotes são testados pelo controle de qualidade segundo normas CLSI e USP e acompanhados de laudos de controle de qualidade, permitindo uma melhor rastreabilidade dos produtos. Customizamos meios de cultura de acordo com a demanda do cliente.

A Plast Labor é pioneira na fabricação de Meios de Cultura com tecnologia de ponta. Instalamos o 1º equipamento de grande porte na distribuição de meios de cultura prontos para uso da América Latina. Todos os nossos meios se mantêm em teste de esterilidade e promoção de crescimento com cepas ATCC, por 24/48 horas.



(21) 2501 0888 . (11) 3862 9008



plabor@plastlabor.com.br

CEPAS ATCC

Cepas padrão da Microbiologics



ATCC Licensed
Derivative

O emblema ATCC[®] Licensed Derivative, a marca de palavra ATCC[®] Licensed Derivative e as marcas ATCC[®] do catálogo são marcas registradas da ATCC[®]. A Microbiologics Inc. é licenciada para usar estas marcas registradas e vender produtos derivados de culturas ATCC[®].



Preocupada com a pirataria a ATCC[™] (American Type Culture Collection), lançou o programa ATCC[™] Licensed Derivative Program[™] para proteger o público, a indústria, as organizações governamentais e acadêmicas do mundo inteiro, que usam materiais derivados da ATCC[™].

Comprando materiais com o emblema ATCC[™] Licensed Derivative[™], os clientes podem confiar que as características foram mantidas e verificadas. A Plast Labor é a primeira distribuidora oficial no Brasil das cepas Microbiologics[®] derivadas ATCC[™]. Após um intenso treinamento junto à equipe da Microbiologics[®], estamos totalmente preparados para atender o mercado brasileiro.



E-SWAB

Sistema Multiuso de Coleta e Transporte



FAÇA UM UPGRADE EM SUAS COLETAS

É o único sistema multiuso de transporte baseado em líquido que mantém a viabilidade das bactérias anaeróbias e aeróbicas por até 48 horas à temperatura ambiente e em geladeira.

- Transporte baseado em líquido facilita a automação.
- Expande a capacidades de testes, você pode executar até 10 testes a partir da mesma amostra, usando 1uL de suspensão.
- Sua versatilidade permite que os laboratórios simplifiquem sua coleta e transporte de amostras para bacteriologia.
- Suporta todos os tipos de bactérias.



WASP LAB

Uma revolução no seu laboratório



A solução definitiva no processamento de amostras pré-analíticas

O WASP® é o novo e revolucionário equipamento para automação de diagnóstico, automaticamente semeia todos os tipos de amostras: swabs, urina, fezes, saliva, fluidos corporais e caldos de pré-enriquecimento. Projetado para trabalhar 24h/dia processando amostras simulando o fluxo de trabalho da rotina realizada pelo laboratório. Usa tecnologia com componentes de última geração, assegurando precisão e confiabilidade.

- Enorme flexibilidade, diversos modos operacionais.
- Alta taxa de transferência agregando rapidez ao laboratório.
- Software Windows, touch screen e sistema de leitura e impressão em código de barras.
- Contém 9 carrosséis para 324 a 378 placas de meios de cultura.
- Capacidade de 60 a 150 sementeiras de placas/hora (de acordo com tipo de sementeira).
- Elimina contaminação cruzada.



CARBAPENEMBAC

Metalo

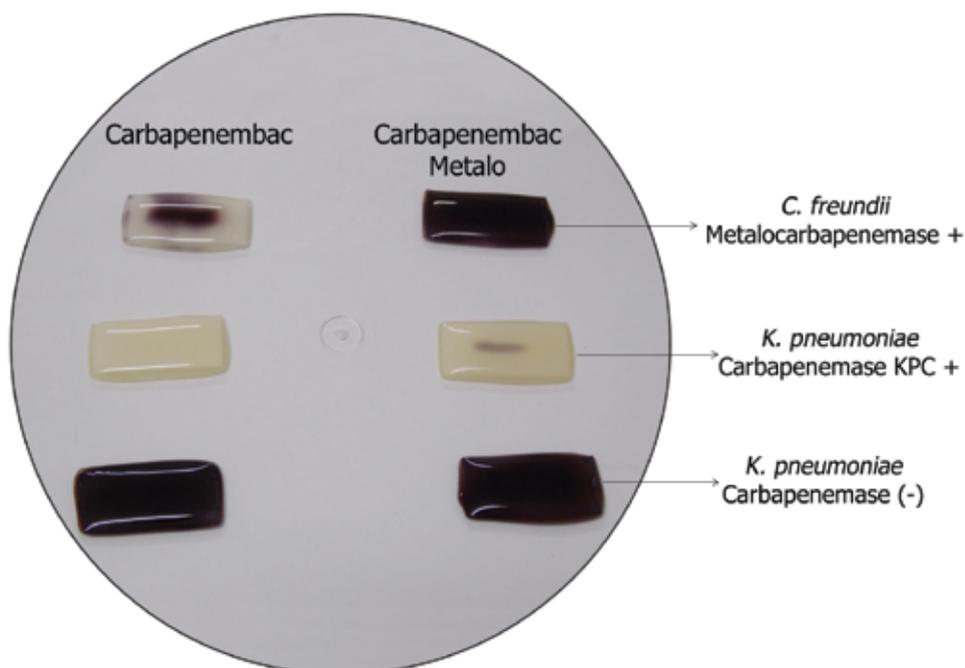
PARA SER UTILIZADO COMO COMPLEMENTO AO PRODUTO CARBAPENEMBAC.

SE A CEPA TIVER RESULTADO POSITIVO, AS FITAS CARBAPENEMBAC METALO DEVEM SER UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE METALOCARBAPENEMASES.

AS FITAS CARBAPENEMBAC METALO DEVEM SER IMPREGNADAS COM A SUSPENSÃO BACTERIANA FEITA NOS TUBOS COM SOLUÇÃO ESPECIAL DE EDTA PROBAC.

NO CASO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE METALOCARBAPENEMASES, A FITA CARBAPENEMBAC DARÁ UM RESULTADO POSITIVO E A FITA CARBAPENEMBAC METALO DARÁ UM RESULTADO NEGATIVO.

SE A CARBAPENEMASE É DE UM TIPO DIFERENTE DAS METALOCARBAPENEMASES, AS DUAS FITAS MOSTRARÃO UM RESULTADO POSITIVO.

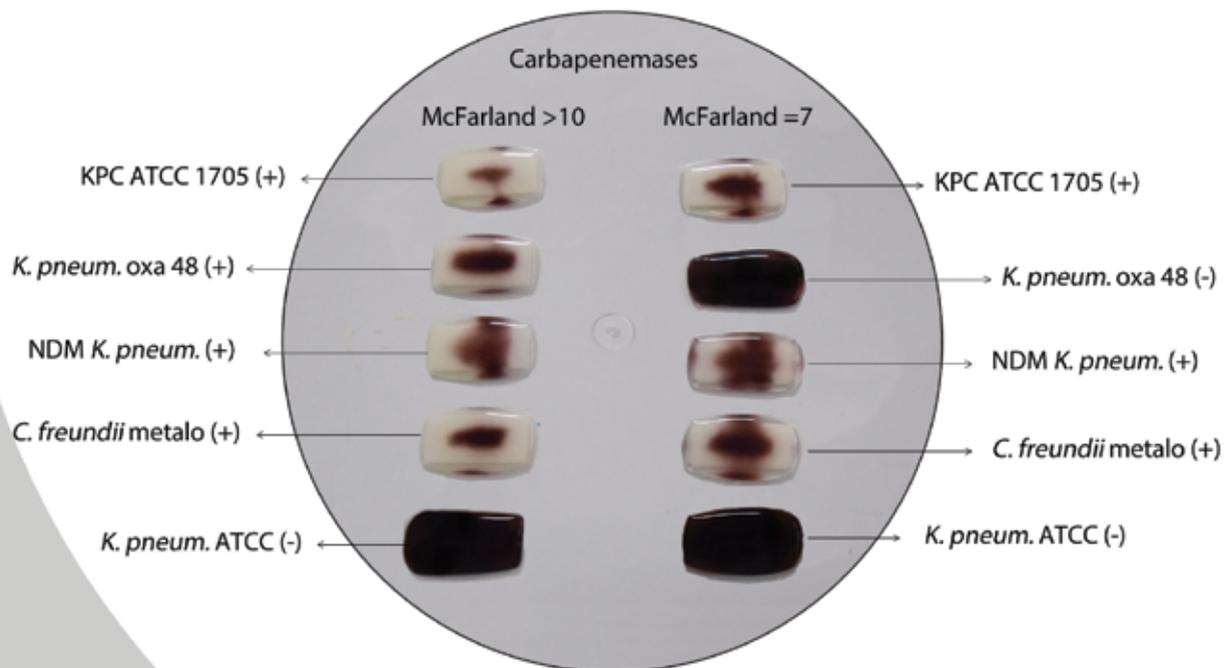


CARBAPENEMBAC

O PRODUTO DESTINA-SE À IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES. AS FITAS POSSUEM, EM SUA COMPOSIÇÃO, CARBAPENÊMICOS EM CONCENTRAÇÃO ADEQUADA PARA QUE AS ENZIMAS (CARBAPENEMASES) PROVOQUEM A HIDRÓLISE DESSES COMPOSTOS. O PRODUTO DA HIDRÓLISE É DETECTADO EM POUCOS MINUTOS INDICANDO QUE A CEPA ESTUDADA PRODUZ CARBAPENEMASES.

PREPARAR O INÓCULO COM SUSPENSÃO 7 E 10 DA ESCALA DE MCFARLAND.

AS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES TIPO KPC E METALO MANTERÃO OS RESULTADOS POSITIVOS, ENQUANTO AS CEPAS PRODUTORAS TIPO OXA DARÃO RESULTADO NEGATIVO COM O INÓCULO MENOR.



CARBAPENEMSELECTBAC

O PRODUTO DESTINA-SE À IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE PORTADORES DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES, QUANDO USADO COM O PRODUTO CARBAPENEMBAC.

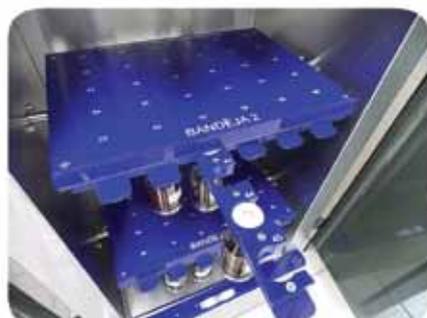
CONSISTE EM 10ML DE MEIO LÍQUIDO SELETIVO ENRIQUECIDO E DE UM LAMINOCULTIVO ESPECIAL.



Estufa Sistema Automatizado Hemobac Trifásico®

NOVOS CONCEITOS E VANTAGENS!

NOVAS BANDEJAS!!!



- DESIGN TOTALMENTE NOVO
- SISTEMA AUTOMATIZADO DE LEITURA
- NOVO SISTEMA DE FIXAÇÃO DOS FRASCOS
- FÁCIL REMOÇÃO E LIMPEZA

NOVO PAINEL!!!



- TELA TOUCH SCREEN 15"
- GERENCIAMENTO DE RESULTADOS POR SOFTWARE
- FÁCIL VIZUALIZAÇÃO DE POSITIVIDADE



HemobacTrifásico[®]

Sistema Automatizado de Detecção Bacteriana



NOVA APRESENTAÇÃO

- SISTEMA DE ACOPLAGEM DO LAMINOCULTIVO SIMPLIFICADO
- MAIOR FACILIDADE NA VISUALIZAÇÃO DE POSITIVIDADE
- INDICADOR DE CO₂ NA TAMPA SUPERIOR
- NOVO SISTEMA DE ENCAIXE NA BANDEJA DA ESTUFA COM MAIOR FACILIDADE DE MANIPULAÇÃO
- NOVO CALDO PARA BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS DISPENSA O USO DE GERADOR E ENVELOPE



Qualidade reconhecida em microbiologia



Um sistema, múltiplos testes

O cobas® 4800 System oferece flexibilidade com o mais avançado sistema de PCR em tempo real disponível atualmente.

Com um menu de testes sempre em expansão que inclui: CT/NG, HPV, MRSA/SA*, Cdiff*, HSV* 1 e 2 e oncologia em uma única plataforma.

Flexibilidade para testar MRSA/SA*, Cdiff* e HSV* 1 e 2 na mesma corrida, preparados a partir de diferentes tubos primários.

Extração da amostra e análise dos resultados totalmente automatizados.



* Produto em fase de aprovação, consulte o representante local para saber sobre sua disponibilidade.

cobas® 4800 - cobas z 480 e cobas® 4800 - cobas x 480 - Reg. ANVISA: 10287410880.

cobas® 4800 CT/NG - Reg. ANVISA: 10287410896, 10287410887, 10287410900, 10287410912, 10287410901.

cobas® 4800 HPV - Reg. ANVISA: 10287410898, 10287410896, 10287410895, 10287410894, 10287410887.

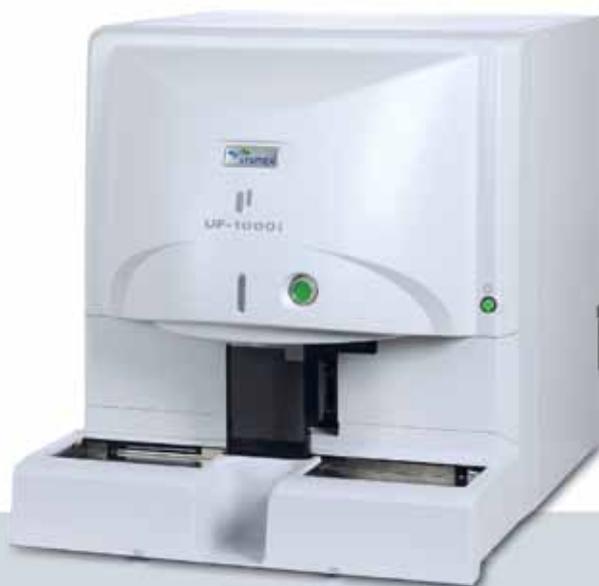


Roche Diagnóstica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1.729, prédio 38 - Jaguaré - CEP 05321-900 - São Paulo/SP - Brasil
0800 77 20 295
www.roche.com.br

Junho/2014

cobas®

Life needs answers



UF-1000i

Introdução

Trata-se de um analisador automatizado para grandes rotinas (= 100 amostras/dia) de urinálise. O analisador Sysmex UF-1000i é aplicado na análise de sedimentos na urina.

O uso do UF-1000i elimina os principais fatores que interferem sedimentoscopia, como:

- Centrifugação das urinas
- Subjetividade da leitura
- Diferentes concentrações de amostras
- Erros de identificação e liberação do resultado

Canal de bactérias

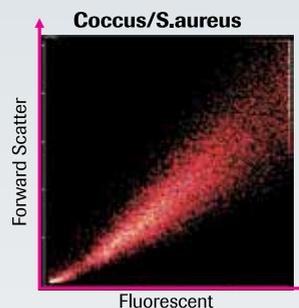
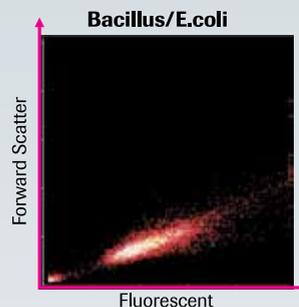
O UF-1000i possui um canal específico para a contagem de bactérias com alta sensibilidade que se correlaciona com contagens de bactérias em cultura a partir de resultado de 10^3 ou 10^5 UFC/mL:

- triagem de uroculturas
- integração da urinálise com a microbiologia

Diferenciais

- Carregamento contínuo, reduzindo o tempo de rotina
- Uso da mesma *rack* (5 posições) do analisador Urisys 2400 (físico-química da urina) da Roche
- Exclui a necessidade de centrifugação da amostra
- Identificação das amostras por leitor de código de barra
- Homogeneização automática das amostras
- Prioridade para amostras urgentes
- Emissão de alarmes para amostras patológicas

Exemplos de Detecção de Bactérias



LightMix[®] Kits

Simplifique o seu dia a dia com ensaios de PCR em tempo real prontos para o uso, para os equipamentos LightCycler[®] e cobas z 480.

Os LightMix[®] kits*, desenvolvidos para os sistemas LightCycler[®] e **cobas z 480**, são ensaios prontos para o uso, contendo sondas de hibridização, iniciadores, controle positivo e instruções de uso.

Doenças tropicais

Chikungunya Virus
Dengue
RVFV
West Nile Virus

Influenza e doenças respiratórias

Influenza A M2
Influenza A H5
Influenza A N1
Influenza A H5N1
Influenza B Tamiflu resistance
Influenza A Virus
Adenovirus
Alpha Antitrypsin (AAT)
Metapneumovirus (MPV)
Parainfluenza Virus 1,2,3
Bordetella pertussis/parapertussis
Chlamydia pneumoniae
Legionella pneumophila (MIP)
Legionella pneumophila 16S
Legionella spp.
Mycoplasma pneumoniae
Pneumocystis jirovecii
Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Infecções do trato urogenital

Mycoplasma hominis
Mycoplasma genitalium
Ureaplasma urealyticum

Oncologia e hematologia

AML1-ETO
BCR-ABL
HER2/neu
inv 16
JAK2 exon 12
MTHFR A1298C

Sistema cardiovascular e coagulação

ApoB-100 R3500Q
ApoE C112R R158C
eNOS E298D
Factor XIII
IL-6 G174C
MTHFR C677T
PAI-1
VKORC1
CYP2C9*2*3

Transplante de órgãos

Human Herpesvirus 6
Human Herpesvirus 8
Polyomaviruses JC and BK

Zoonoses

Alkhurma Virus
Bacillus anthracis
Borrelia spp.
Brucella genus
Coxiella burnetii
Francisella tularensis
Listeria monocytogenes
Toxoplasma gondii
Yersinia pestis



LightMix[®] Modular Assays

Produzido por TIB MOLBIOL

*Detecção Multiplex de Patógenos.
Simples e fácil. Para você.*

Um conceito simples. Três grandes benefícios.



Fácil de usar

Selecione a partir de diversas opções de ensaios individuais para a detecção de patógenos prontos para o uso.

Design modular

Monte painéis customizados, específicos para suas necessidades.

Detecção simultânea

Aumente a capacidade e otimize seu fluxo de trabalho com ensaios multiplex contendo até 5 alvos diferentes e um controle em um único tubo.

Simplifique!

Elimine a complexa etapa de otimização.

Selecione um painel. Escolha entre mais de 30 alvos*.

Os LightMix[®] Modular Assays são otimizados para os equipamentos de PCR em tempo real, reagentes e controles da Roche, garantindo a você um fluxo de trabalho eficiente e completo.

| Parasitas | Bactérias | Vírus (em breve) | Carbapene-mase | EHEC | Respiratórios | Recém-nascidos | Bactéria não cultivável |
|------------------------------|----------------------|------------------|----------------|-----------|-----------------------|----------------|-------------------------|
| <i>Giardia</i> | <i>Aeromonas</i> | Norovirus GG1 | KPC | STX1-EHEC | Influenza A H7 (H7N9) | Modular TREC | <i>T. whipplei</i> |
| <i>Dientamoeba</i> | <i>Yersinia</i> | Norovirus GG2 | NDM1 | STX2-EHEC | Influenza A | Modular KREC | |
| <i>Cryptosporidium</i> | <i>Campylobacter</i> | Adenovirus F | OXA-48 | EAE-EHEC | Influenza B | | |
| <i>Blastocystis</i> | <i>Shigella</i> | Rotavirus | GES | | MERS - CoV Orf1a | | |
| <i>Entamoeba</i> | <i>Salmonella</i> | Enterovirus | IMP | | MERS - CoV upE | | |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | <i>Plesiomonas</i> | Astrovirus | IMp (R6G) | | | | |
| | | | VIM | | | | |
| | | | VIM | | | | |

MagNA Pure Systems

Extração automatizada de ácidos nucleicos sob medida para você

Tecnologia baseada em beads magnéticas

Qualidade

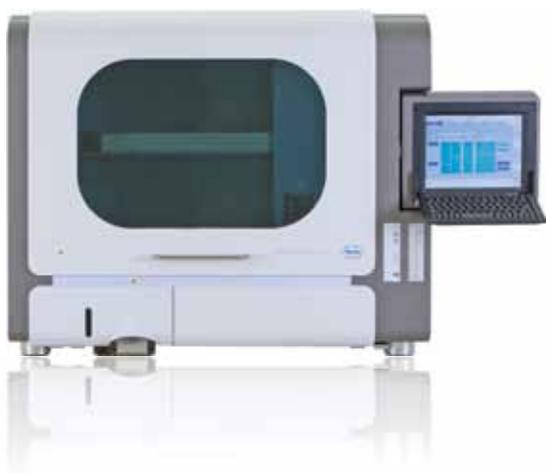
- Ácidos nucleicos com elevado grau de pureza para quaisquer aplicações, a partir de grande variedade de tipos de amostras

Eficiência

- Automação walk-away, processa até 8 amostras em até 45 minutos
- Software intuitivo e interface touch-screen

Segurança

- Filtro HEPA integrado e lâmpada de UV, minimizam o risco de contaminações cruzadas



Rapidez

- Até 32 amostras em menos de 60 minutos
- Automação “true walk away”

Conveniência

- Permite a programação de protocolos pós-isolamento, como a pipetagem de amostras e reagentes na placa de PCR em tempo real

Confiança

- Fácil rastreamento de amostras
- Lâmpada de UV integrada

MagNA Pure

Patologia Clínica Medicina Laboratorial



**SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
PATOLOGIA
CLÍNICA
MEDICINA
LABORATORIAL**

**Conheça
Aprenda
Curta Siga
Associe-se
Compartilhe
Divulgue
Participe**

é a especialidade médica que atua na área de laboratórios clínicos. Os exames mais frequentes são realizados em sangue, urina, fezes e outros líquidos biológicos.

O Patologista Clínico é o médico especialista em Medicina Laboratorial, que obteve sua titulação através de atendimento a critérios técnicos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

A Sociedade e seus associados

A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /Medicina Laboratorial é uma sociedade de especialidade médica fundada em 1944.



| Pessoa Física | | | | | | Pessoa Jurídica | | | |
|---------------|---------------------------|----------------|------------|----------|--------|-----------------|--------------|----------------|---|
| Médicos | Farmacêuticos Bioquímicos | Universitários | Biomédicos | Biólogos | Outros | São Paulo | Minas Gerais | Rio de Janeiro | Outros Estados (BA, ES, GO, PR, RS, SC) |
| 59,5% | 16% | 10,9% | 7,8% | 3,1% | 2,7% | 57,4% | 13% | 11,1% | 18,5% |

Nosso Propósito

Propiciar ao associado o interrelacionamento e desenvolvimento científico e profissional, acesso à atualização científica e técnica e a assuntos relacionados ao mercado, gerando e divulgando informações, através de publicações e eventos.

Oferecer meios para o desenvolvimento empresarial e de gestão de negócios.

**congressos
brasileiros**
(média por congresso - últimos 5 anos)

| | | | | |
|----------------------|---------------|--------------|------------------------|-------------------------------------|
| Expositores empresas | Participantes | Palestrantes | Atividades Científicas | Área de Exposição (m ²) |
| 98 | 3480 | 158 | 112 | 7098 |

**acessos na
internet**
(média anual de acessos - últimos 5 anos)

| | | | | |
|---|--------------------------------|----------------------------|--|--------------------------------|
| Site Labtests Online BR labtestsonline.org.br | Site Institucional sbpc.org.br | Boletim Semanal Eletrônico | Site Biblioteca Digital biblioteca.sbpc.org.br | Site do Congresso copam.org.br |
| 1.006.861 | 306.707 | 192.000 | 18.219 | 10.440 |

**www.
sbpc.org.br**

Eventos



Conheça
Aprenda
Curta Siga
Associe-se
Compartilhe
Divulgue
Participe

Cidades que já
receberam nossos
Eventos

Rio de Janeiro
Belo Horizonte
Vitória
São José dos Campos
Brasília
São Paulo
Florianópolis
Campinas
Goiânia
Natal
Recife
Salvador
Belém
Porto Alegre
Ribeirão Preto
Curitiba
Santos
Maceió
Guarujá
Manaus
Fortaleza
Joinville
Cuiabá



Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial Exposição Técnico-científica

Evento científico anual, com palestrantes brasileiros e estrangeiros.

Na Exposição Técnico-científica são apresentados produtos, equipamentos e serviços para laboratórios clínicos.

Organizado em capitais de importância comercial, industrial, turística e cultural, oferece sempre grandes oportunidades a todos os nichos de negócios

Jornadas de Patologia Clínica Medicina Laboratorial

Eventos científicos regionais realizados pela SBPC/ML ou em conjunto com outras instituições científicas.

Mais informações nos *sites*
do congresso e da SBPC/ML

www.cbpcml.org.br

www.sbpc.org.br

Cursos & Workshops

Eventos científicos com temas específicos para facilitar o entendimento de normas e procedimentos.

Conheça nossos serviços de Formação, **Qualidade** e **Informações**



TEPAC

Título de Especialista em Patologia Clínica/Medicina Laboratorial - Tradicional e Especial



Cursos de auditor PALC



Curso de Extensão Universitária



Publicações Técnicas



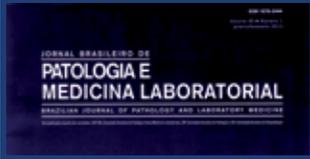
Biblioteca Digital SBPC/ML



Ensino à Distância - EAD



Apoio a Residência Médica



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

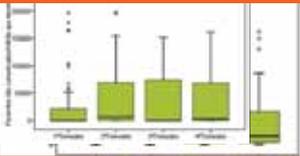


Certificação Internacional ASCPi



PALC

Programa de Acreditação de
Laboratórios Clínicos



Programa de Indicadores Laboratoriais

Controle de Qualidade/PELM
Proficiência em Enaios Laboratoriais

PELM O PELM (Proficiência em
Interlaboratorial de resul
a todos os laboratórios e
extremamente importantes
relação aos seus processo
técnicos, calibrações, controles etc.), o que possível

Ensaio de Proficiência



Certificação Digital de Laudos



Portal SBPC/ML



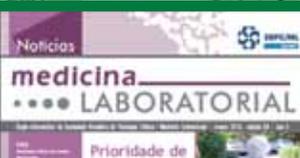
Site do Congresso



Labtests Online BR



Boletim Eletrônico Semanal



Revista “Notícias Medicina Laboratorial”

Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos



A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial sabe que, para os médicos, a confiança no laboratório é fundamental. Um exame preciso contribui para um diagnóstico correto e, conseqüentemente, proporciona um tratamento eficaz para o paciente.

É por isto que a SBPC/ML criou o Programa de Acreditação de Labo-

ratórios Clínicos - PALC, que, baseado no atendimento de padrões técnicos internacionais, monitora do começo ao fim o processo laboratorial.

Assegure-se que o seu laboratório possua este selo. Ele é a garantia de bons resultados para você e para os seus pacientes.

Confiança, respeito e qualidade durante todo o processo laboratorial

Mais informações em: www.sbpc.org.br/palc

Norma PALC

Atualizada periodicamente para se manter em dia com os padrões internacionais e os avanços da Medicina Laboratorial.

Audidores multidisciplinares

Profissionais com formação de nível superior em diferentes áreas do setor de diagnóstico laboratorial.

CALC

A Comissão de Acreditação de Laboratórios Clínicos (CALC) é formada por profissionais com renomada competência no setor.

Cursos e workshops

Formação de auditores internos e externos e *workshops* para acreditação laboratorial, realizados em diferentes cidades.

Realização:



A microbiologia clínica é uma das grandes áreas do laboratório clínico cuja atividade laboratorial, com vistas à elucidação diagnóstica, pode ser caracterizada como de alta complexidade, constituindo-se em um processo que desafia os profissionais que militam nesta área de atuação.

Esta obra tem como objetivo apresentar as Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) discutindo as boas práticas em microbiologia clínica, abordando os tópicos relevantes, as dúvidas e os questionamentos mais frequentes da rotina diária.

O projeto contou com a participação de uma equipe multidisciplinar composta por profissionais formadores de opinião e com grande experiência na área de microbiologia clínica.

O livro utiliza uma linguagem simples e é uma ferramenta de grande utilidade para todos os profissionais do laboratório clínico da área de microbiologia.

O arquivo completo também se encontra disponível para livre *download* no site da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial: www.sbpc.org.br

Apoio:

