



*Manual de Bacteriologia
da Tuberculose*

Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde
Centro de Referência Professor Hélio Fraga

Manual de Bacteriologia da Tuberculose

3ª Edição

Edição comemorativa

Rio de Janeiro
2005

Produção

Paisagem Editorial

Projeto Gráfico

Noel Rabacov

Revisão

Beatris Nunes da Silva

Fotografias

César Duarte

Catálogo na fonte

Maria de Lourdes Lima

Coordenação:

Centro de Referência Professor Hélio Fraga

Estrada da Curicica, 2000 Jacarepaguá - Rio de Janeiro/RJ

Tel.: (55) (021) 2448-6872

e-mail - crphf@saude.gov.br

angela.werneck@saude.gov.br

FICHA CATALOGRÁFICA

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3ª ed. Edição comemorativa Rio de Janeiro: 2005.

240p. il.

1. Tuberculose. 2. Laboratório - Diagnóstico clínico. 3. Biossegurança. I. Brasil. Ministério da Saúde. II. Secretaria de Vigilância em Saúde. III. Centro de referência Prof. Hélio Fraga. IV. Departamento de Vigilância Epidemiológica. V. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. VI. Título.

CDD: 616.995076 - 19ª ed.

3ª EDIÇÃO - EDIÇÃO COMEMORATIVA - COORDENAÇÃO E ELABORAÇÃO TÉCNICOS DO CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA

Angela Maria Werneck Barreto
Carlos Eduardo Dias Campos
Fátima Moreira Martins
Paulo César de Souza Caldas

COLABORAÇÃO

Helio Lionel †
Marinez Francisco da Silva

2ª EDIÇÃO - COORDENAÇÃO E ELABORAÇÃO - TÉCNICOS DO CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA

Angela Maria Werneck Barreto
Carlos Eduardo Dias Campos
Fátima Moreira Martins
Clara Leda Gonçalves Menezes (digitação)

COLABORAÇÃO

Clara Eliane do Nascimento Barreto - Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels Dalair
Antonia Neto de Souza Coordenação Geral do Sistema de Laboratórios de Saúde Pública
Francisco José de Almeida Oliveira - Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels
Leila de Souza Fonseca - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Lizete Schaefer Bezem - Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
Luzia Tavares Marques Vieira - Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
Obaida Ale Freire - Coordenação Nacional do Sistema de Laboratórios de Saúde Pública
Paulo Pinto Gontijo Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Terezinha de Jesus Maia Vieira - Instituto de Saúde do Distrito Federal

1ª EDIÇÃO - ELABORAÇÃO

Alonso Favero Kopke - Fundação Ezequiel Dias
Augusto da Costa Santiago - Instituto de Tisiologia e Pneumologia da UFRJ
Ernesto Leibovich - Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária
Ivo de Paula Soares - Sanatório Partenon
José Benício Nunes de Miranda - Instituto Adolfo Lutz
José Messias Dias Filho - INAMPS
Laerte Manhães de Andrade - Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária
Milton Fontes Magarão - Fundação Ataulpho de Paiva
Paulo Pinto Gontijo Filho - Instituto de Microbiologia da UFRJ
Sérgio Magarão - Faculdade de Ciências Médicas do Rio de Janeiro

† *in memoriam*

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Humberto Costa Lima

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
Jarbas Barbosa da Silva Jr.

CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA
Miguel Aiub Hijjar

SERVIÇO DE LABORATÓRIO
Angela Maria Werneck Barreto

APRESENTAÇÃO

Neste ano o Laboratório de Referência Nacional comemora seus 21 anos com a 3ª edição do Manual de Bacteriologia da Tuberculose, em plena maturidade, abordando as técnicas utilizadas em sua rotina com uma roupagem que antevê atender às tendências da sociedade globalizada no âmbito da qualidade total.

No decorrer destes anos, nossas atividades permitiram desenvolver projetos de interesse nacional de vigilância da tuberculose, além da capacitação de recursos humanos da rede pública, assim como a introdução e o aprimoramento das técnicas fundamentais para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose nestes laboratórios de saúde pública. As pesquisas realizadas em colaboração com esta rede permitiu, além da geração de conhecimento específico, uma real integração e consolidação destas unidades.

Esta rede mantém-se através de um trabalho de fortalecimento e aprimoramento constante destas atividades e sobretudo da nossa própria experiência, sendo repassada para estes laboratórios.

A biossegurança e a gestão da qualidade são os componentes essenciais que estão sendo perseguidos pela rede de laboratórios na busca pela qualidade total, dentro dos requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, que a norma NBR ISO/IEC 17025 dispõe. Neste particular o laboratório de referência vem trabalhando na elaboração e implementação de procedimentos operacionais padronizados, utilizando também reagentes de qualidade comprovada, certificada, assim como instrumentos aferidos e com o selo da Rede Brasileira de Calibração.

Com a implantação do laboratório em novas dependências segundo os padrões internacionais de biossegurança em 2005, vamos dar um passo decisivo para servir como um novo paradigma para a rede laboratorial de saúde pública, preocupado com a segurança humana e ambiental nos aspectos mais amplos possíveis.

Angela Maria Werneck Barreto
Chefe do Laboratório de Referência Nacional

O controle da tuberculose no país, hoje definido como prioridade de governo, vem sendo acompanhado de implementação nas áreas de prevenção, diagnóstico e tratamento.

As recomendações de Programa Nacional de Controle da Tuberculose –PNCT- de realizar culturas e testes de sensibilidade para todos os pacientes de retratamento, reforçam a necessidade de um manual que oriente adequadamente os procedimentos laboratoriais.

Esperamos que este Manual de Bacteriologia contribua para o esforço do PNCT, difundindo conhecimento e garantindo a qualidade.

Miguel Aiub Hijjar
Diretor do CRPHF

SUMÁRIO

1- BIOSSEGURANÇA

1.1- INTRODUÇÃO	17
1.2- RISCO DE INFECÇÃO NO PESSOAL DO LABORATÓRIO	17
1.3- COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA E COMITÊ DA QUALIDADE	17
1.4- GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS	18
1.5- RECOMENDAÇÕES GERAIS	18
1.5.1- PARA O PESSOAL	18
1.5.2- REFERENTES AO LABORATÓRIO	19
1.6- SEGURANÇA BIOLÓGICA	19
1.6.1- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPIS)	19
1.6.2- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA (EPCS)	20
1.6.3- ANTI-SÉPTICOS E DESINFETANTES	20
1.6.4- COMO PROCEDER EM CASO DE ACIDENTE	20
1.7- PROJETO ARQUITETÔNICO DO LABORATÓRIO (BARREIRA SECUNDÁRIA)	21
1.8- SEGURANÇA QUÍMICA	22
1.8.1- MANIPULAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS	22
1.8.1.1- Produtos Tóxicos	22
1.8.1.2- Produtos Corrosivos	22
1.8.1.3 - Produtos Químicos Especiais (peróxidos, cloratos, percloratos, nitratos, etc.)	23
1.8.1.4- Produtos Pirofóricos	23
1.8.1.5- Cilindros de Gás Comprimido	24
1.8.1.6- Armazenamento de Produtos Químicos	24
1.8.1.7- Derramamentos Acidentais de Produtos Químicos	24
1.8.2- EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA E EMERGÊNCIA	25
1.8.3- EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO COLETIVA	25
1.8.3.1- Cabines de Exaustão de Gases	25
1.8.3.2- Chuveiro de Emergência	25
1.8.3.3- Lavador de Olhos	25
1.8.3.4- Extintores de Incêndio	26
1.8.4- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL	26
1.8.4.1- Aventais	26
1.8.4.2- Luvas	26
1.8.4.3- Botas de Segurança	26
1.8.4.4- Óculos de Segurança e Protetores Faciais	27
1.8.4.5- Máscara de Proteção Respiratória	27
1.8.4.6- Mantas Corta-Fogo	27
1.8.5- PROCEDIMENTOS EM SITUAÇÕES DE EMERGÊNCIA	27
1.8.5.1- Recomendações Gerais	27
1.8.5.2- Incêndio: Fontes, Classes e Combate	29
1.9- BIBLIOGRAFIA	29
ANEXOS	
FIGURA 1- CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA CLASSE II - BII	30
FIGURA 2- PICTOGRAMAS INDICATIVOS DO TIPO DE PERICULOSIDADE DOS REAGENTES	30
FIGURA 3- PLANTA DE UM LABORATÓRIO NB3	31
TABELA 1- SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS PERIGOSAS E USO DE EPIS	32
TABELA 2- SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS, CLASSIFICAÇÃO E INCOMPATIBILIDADE	33
TABELA 3- TIPOS DE EXTINTORES DE INCÊNDIO E SUA UTILIZAÇÃO	34

2- GERENCIAMENTO DE AMOSTRAS

2.1- INTRODUÇÃO	37
2.2- COLHEITA DE ESCARRO	37
2.2.1- ESCARRO DE EXPECTORAÇÃO	37
2.2.1.1- Qualidade e Quantidade da Amostra	37
2.2.1.2- Recipiente	37
2.2.1.3- Local da Colheita	37
2.2.1.4- Momento da Colheita e Número de Amostras	37

2.2.1.5- Orientação ao Paciente	38
2.2.1.6- Lavado Gástrico	38
2.2.1.7- Lavados Brônquicos (tráqueo-brônquico, broncoalveolar)	38
2.2.1.8- Expectoração Induzida	38
2.3- COLHEITA DE OUTROS MATERIAIS	39
2.3.1- URINA	39
2.3.2- LÍQUIDOS ASSÉPTICOS (Líquor, Líquidos Pleural, Ascítico, Sinovial, Pericárdico, Peritoneal)	39
2.3.3- MATERIAL DE RESSECÇÃO, BIÓPSIA	39
2.3.4- PUS	39
2.3.5- SANGUE	39
2.3.6- FEZES	39
2.4- CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE	40
2.5- RECEPÇÃO DE AMOSTRAS	40
2.5.1- MATERIAL CLÍNICO	40
2.5.2- CULTURAS	40
2.6- CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO E REJEIÇÃO DE AMOSTRAS	40
2.7- ARMAZENAMENTO	41
2.8- ENVIO DE MATERIAIS	41
2.9- AMOSTRAS-TIPO	41
2.10- BIBLIOGRAFIA	43

3- BACILOSCOPIA

3.1- IMPORTÂNCIA	47
3.2- PREPARAÇÃO	47
3.3- RECOMENDAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA	48
3.4- PROCEDIMENTOS	48
3.4.1- MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN	48
3.4.1.1- Princípio	48
3.4.1.2- Soluções	48
3.4.1.2.1- Fucsina Fenicada a 0,3%	48
3.4.1.2.2- Fenol Aquoso	48
3.4.1.2.3- Azul de Metileno a 0,1%	48
3.4.1.2.4- Solução Descorante	48
3.5- TÉCNICA	49
3.6- LEITURA E INFORME DE RESULTADOS	49
3.7- MATERIAL UTILIZADO	50
3.8- CONTROLE DE QUALIDADE	51
3.8.1- FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR O RESULTADO GERAL DO EXAME	52
3.9- ILUSTRAÇÕES	52
3.10- BIBLIOGRAFIA	53

ANEXOS

FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO FENOL LÍQUIDO PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN ..	54
FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN	55

4- CULTURA

4.1- INDICAÇÃO	59
4.2- PROCEDIMENTOS DE ISOLAMENTO	59
4.3- MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO	59
4.3.1- MÉTODO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO	60
4.3.1.1- Indicação	60
4.3.1.2- Soluções	60

4.3.1.2.1- Solução Descontaminante e Fluidificante (Solução "A")	60
4.3.1.2.2- Solução Neutralizante (Solução "B")	60
4.3.1.2.3- Solução de Azul de Bromotimol ou Púrpura de Bromocresol a 0,4% (Solução "C")	60
4.3.1.3- Procedimento	60
4.3.2- MÉTODO DE CORPER & STONER, MODIFICADO (6)	61
4.3.2.1- Indicação	61
4.3.2.2- Soluções	61
4.3.2.2.1- Solução de Fosfato Trissódico a 23% (Solução "A")	61
4.3.2.2.2- Solução de Fosfato Monossódico a 20% (Solução "B")	61
4.3.2.2.3- Procedimento	61
4.4- MEIOS DE CULTURA	61
4.4.1- MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN (LJ)	62
4.4.1.1- Preparação de 1 Fórmula (1.600ml de meio base)	62
4.4.2- MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM PIRUVATO (PI)	62
4.4.3- MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM CITRATO FÉRRICO AMONÍACAL (CFA)	63
4.4.3.1- Preparação	63
4.4.4- MEIO LÍQUIDO 7H9 DE MIDDLEBROOK	63
4.4.4.1- Preparação da Base	63
4.4.4.2- Enriquecimento ADC	63
4.4.4.2.1- Preparação	63
4.4.5- MEIO LÍQUIDO 7H9 DE MIDDLEBROOK COM SPS	64
4.4.5.1- Preparação	64
4.4.6- INCUBAÇÃO E LEITURA DE RESULTADOS	64
4.5- BIOSSEGURANÇA	65
4.6- MATERIAL NECESSÁRIO	65
4.7- ILUSTRAÇÕES	66
4.8- BIBLIOGRAFIA	67
ANEXOS	
QUADRO 1- COMPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE MICOBACTÉRIAS	68
FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA O MÉTODO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO	69
FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO INDICADOR DE pH PARA O MÉTODO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO ..	70
FICHA 3- CONTROLE DO REAGENTE "A" PARA O MÉTODO DE CORPER-STONER	71
FICHA 4- CONTROLE DO REAGENTE "B" PARA O MÉTODO DE CORPER-STONER	72
FICHA 5- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA LOWENSTEIN JENSEN	73
FICHA 6- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PIRUVATO DE SÓDIO	74
FICHA 7- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM CITRATO FÉRRICO AMONÍACAL	75
FICHA 8- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA MIDDLEBROOK 7H9	76
FICHA 9- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO ENRIQUECIMENTO ADC	77
FICHA 10- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA MIDDLEBROOK 7H9 COM SPS	78
FICHA 11- LEITURA E REGISTRO DOS RESULTADOS	79

5- IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIA

5.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS	83
5.2- ESPÉCIES DE INTERESSE EM PATOLOGIA HUMANA	83
5.3- BIOSSEGURANÇA	83
5.4- IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	84
5.5- TEMPO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTO	85
5.5.1- PRINCÍPIO	85
5.5.2- TÉCNICA	85
5.5.3- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	85
5.5.4- RESULTADO	86
5.6- CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AGENTES INIBIDORES	86
5.6.1- INDICAÇÃO	86
5.6.2- PREPARAÇÃO E TÉCNICA	86
5.6.3- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	87
5.6.4- CONTROLE DE QUALIDADE	87

5.7- CRESCIMENTO EM GELOSE NUTRITIVA	87
5.7.1- INDICAÇÃO	87
5.7.2- PREPARAÇÃO	87
5.7.2.1- Meio de Cultura	87
5.7.3- TÉCNICA	87
5.7.4- LEITURA	87
5.7.5- CONTROLE DE QUALIDADE	87
5.8- CRESCIMENTO EM AGAR MacCONKEY	88
5.8.1- INDICAÇÃO	88
5.8.2- PREPARAÇÃO	88
5.8.2.1- Meio de Cultura	88
5.8.3- TÉCNICA	88
5.8.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	88
5.8.5- CONTROLE DE QUALIDADE	88
5.9- CRESCIMENTO EM MEIO COM CLORETO DE SÓDIO A 5%	88
5.9.1- PRINCÍPIO	88
5.9.2- PREPARAÇÃO	89
5.9.3- TÉCNICA	89
5.9.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	89
5.9.5- CONTROLE DE QUALIDADE	89
5.10- PRODUÇÃO DE NIACINA	89
5.10.1- PRINCÍPIO E INDICAÇÃO	89
5.10.2- PREPARAÇÃO	90
5.10.2.1- Solução Salina a 0,85%	90
5.10.3- TÉCNICA	90
5.10.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	90
5.10.5- CONTROLE DE QUALIDADE	90
5.11- REDUÇÃO DO NITRATO	91
5.11.1- INDICAÇÃO	91
5.11.2- SOLUÇÕES	91
5.11.2.1- Solução Substrato (solução de nitrato de sódio 0,01 M em tampão fosfato 0,022 M, pH 7,0)	91
5.11.2.2- Reativos	91
5.11.2.3- Escala Padrão Para Leitura	91
5.11.3- TÉCNICA	92
5.11.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	92
5.11.5- CONTROLE DE QUALIDADE	93
5.12- CATALASE A 68°C	93
5.12.1- INDICAÇÃO	93
5.12.2- SOLUÇÕES	93
5.12.2.1- Solução de Tampão Fosfato M/15, pH 7,0 segundo Soerensen	93
5.12.2.2- Peróxido de Hidrogênio a 30% ou 110 volumes (Superoxol, Perhidrol)	93
5.12.2.3- Solução de TWEEN 80 a 10%	93
5.12.2.4- Solução Reveladora	93
5.12.3- TÉCNICA	94
5.12.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	94
5.12.5- CONTROLE DE QUALIDADE	94
5.13- BETA-GLICOSIDASE	94
5.13.1- INDICAÇÃO	94
5.13.2- SOLUÇÕES	94
5.13.2.1- Solução Substrato	94
5.13.2.2- Solução de Tampão TRIS a 0,05 m	95
5.13.3- TÉCNICA	95
5.13.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	95
5.13.5- CONTROLE DE QUALIDADE	95
5.14- HIDRÓLISE DO TWEEN 80	95
5.14.1- INDICAÇÃO	95
5.14.2- PRINCÍPIO	95
5.14.3- SOLUÇÕES	96
5.14.3.1- Solução Substrato	96

5.14.4- TÉCNICA	96
5.14.5- LEITURA	96
5.14.6- CONTROLE DE QUALIDADE	96
5.15- CAPTAÇÃO DO FERRO	96
5.15.1- INDICAÇÃO	96
5.15.2- PREPARAÇÃO	97
5.15.3- TÉCNICA	97
5.15.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	97
5.15.5- CONTROLE DE QUALIDADE	97
5.16- UREASE	97
5.16.1- INDICAÇÃO E PRINCÍPIO	97
5.16.2- PREPARAÇÃO	97
5.16.3- TÉCNICA	97
5.16.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	98
5.16.5- CONTROLE DE QUALIDADE	98
5.17- UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES (INOSITOL- MANITOL- CITRATO DE SÓDIO)	98
5.17.1- INDICAÇÃO	98
5.17.2- PREPARAÇÃO	98
5.17.2.1- Meio Base	98
5.17.2.2- Solução de Açúcares	99
5.17.2.2.1- Solução de Inositol ou Manitol	99
5.17.2.2.2- Solução de Citrato de Sódio	99
5.17.3- TÉCNICA	99
5.17.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	99
5.17.5- CONTROLE DE QUALIDADE	99
5.18- REDUÇÃO DO TELURITO DE POTÁSSIO	99
5.18.1- PRINCÍPIO DO TESTE	99
5.18.2- INDICAÇÃO	100
5.18.3- PREPARAÇÃO	100
5.18.3.1- Meio Líquido de 7H-9 de Middlebrook	100
5.18.3.2- Solução de Telurito de Potássio a 0,2%	100
5.18.4- TÉCNICA	100
5.18.5- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	100
5.18.6- CONTROLE DE QUALIDADE	101
5.19- ARILSULFATASE	101
5.19.1- INDICAÇÃO	101
5.19.2- SOLUÇÕES	101
5.19.2.1- MEIO LÍQUIDO DE 7H-9 DE MIDDLEBROOK	101
5.19.2.2- SOLUÇÃO SUBSTRATO	101
5.19.2.3- SOLUÇÃO REVELADORA (Carbonato de sódio 2N)	101
5.19.3- PREPARAÇÃO	101
5.19.4- TÉCNICA	102
5.19.5- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	102
5.19.6- CONTROLE DE QUALIDADE	102
5.20- ILUSTRAÇÕES	102
5.21- BIBLIOGRAFIA	105
ANEXOS	
ESQUEMA 1- PREPARAÇÃO DA ESCALA PADRÃO PARA A LEITURA DO NITRATO	107
ESQUEMA 2- PREPARAÇÃO DOS REATIVOS DA β-GLICOSIDADE	107
ESQUEMA 3- PREPARAÇÃO DO MEIO PARA UTILIZAÇÃO DOS AÇUCARES	107
TABELA 1- IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS CLINICAMENTE MAIS IMPORTANTES	108
FICHA 1- RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	109
FICHA 2- CONTROLE DOS REAGENTES PARA CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AGENTES INIBIDORES	110
FICHA 3- RESULTADO DE LEITURA DO TESTE DE CRESCIMENTO EM AGENTES INIBIDORES	111
FICHA 4- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE GELOSE NUTRITIVA	112
FICHA 5- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE ÁGAR MacCONKEY SEM CRISTAL VIOLETA	113
FICHA 6- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM NaCl	114
FICHA 7- CONTROLE DE PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO SUBSTRATO PARA A PROVA DA REDUÇÃO DO NITRATO ...	115
FICHA 8- CONTROLE DE PREPARAÇÃO DOS REAGENTES REVELADORES DA PROVA DA REDUÇÃO DO NITRATO ...	116

FICHA 9- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO AZUL DE BROMOTIMOL A 1%	117
FICHA 10- CONTROLE DE PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA LEITURA DA PROVA DA REDUÇÃO DO NITRATO ..	118
FICHA 11- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO TWEEN 80 PARA A PROVA DA CATALASE	119
FICHA 12- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA A PROVA DA CATALASE	120
FICHA 13- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA A PROVA DA BETA-GLICOSIDASE	121
FICHA 14- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO TAMPÃO PARA A PROVA DA BETA-GLICOSIDASE	122
FICHA 15- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DO VERMELHO NEUTRO A 0,1%	123
FICHA 16- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO PARA A PROVA DA HIDRÓLISE DO TWEEN 80	124
FICHA 17- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM CITRATO FÉRRICO AMONÍACAL ..	125
FICHA 18- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A PROVA DA UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES ..	126
FICHA 19- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DOS AÇÚCARES	127
FICHA 20- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA MIDDLEBROOK 7H9	128
FICHA 21- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO REAGENTE PARA A PROVA DA REDUÇÃO DO TELURITO DE POTÁSSIO ..	129
FICHA 22- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO PARA A PROVA ARILSULFATASE	130
FICHA 23- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO CARBONATO DE SÓDIO PARA A PROVA DA ARIL SULFATASE	131
FICHA 24- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM SUBSTRATO DA PROVA ARILSULFATASE	132

6- TESTE DE SENSIBILIDADE DE *M. TUBERCULOSIS* AOS ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

6.1- INTRODUÇÃO	135
6.2- INDICAÇÃO	135
6.3- METODOLOGIA	135
6.4- MÉTODO DAS PROPORÇÕES	135
6.4.1- PRINCÍPIO	135
6.4.2- PREPARAÇÃO DO MEIO COM DROGAS	136
6.4.2.1- Meio com Pirazinamida	136
6.4.3- TÉCNICA	137
6.4.3.1- Preparação da Suspensão Bacilar, Diluição e Semeadura	137
6.4.3.1.1- Teste Indireto	137
6.4.3.1.2- Teste Direto	138
6.4.3.2- Incubação	138
6.4.3.3- Leitura e Interpretação	138
6.4.3.4- Controle de Qualidade	139
6.5- BIOSSEGURANÇA	140
6.6- MATERIAL UTILIZADO	140
6.7- BIBLIOGRAFIA	142

ANEXOS

ESQUEMA 1- PREPARAÇÃO DO MEIO COM DROGAS	143
ESQUEMA 2- PREPARAÇÃO DE INÓCULO E SEMEADURA DO TESTE INDIRETO	145
ESQUEMA 3- PREPARAÇÃO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE DIRETO	146
ESQUEMA 4- PREPARAÇÃO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE	146
ESQUEMA 5- PREPARAÇÃO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE DIRETO	146
FICHA 1- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA TESTE DE SENSIBILIDADE AS DROGAS ...	148
FICHA 2- CONTROLE DOS REAGENTES PARA CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AGENTES INIBIDORES	149
FICHA 3- CONTROLE DOS RESULTADOS DE LEITURA DO TESTE DE SENSIBILIDADE/AGENTES INIBIDORES	150

7- MÉTODO AUTOMATIZADO (MB/BacT) PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE

7.1- INTRODUÇÃO	153
7.2- PRINCÍPIO E INDICAÇÃO	153
7.3- TESTE DIRETO	153
7.3.1- TÉCNICA	154
7.4- TESTE INDIRETO	154
7.4.1- TÉCNICA	154
7.5- CONCENTRAÇÃO DAS DROGAS	155
7.6- LEITURA E INTERPRETAÇÃO	156

7.7- CONTROLE DE QUALIDADE	156
7.8- BIOSSEGURANÇA	156
7.9- MATERIAL	157
7.10- ILUSTRAÇÕES.....	158
7.11- BIBLIOGRAFIA.....	158

ANEXOS

ESQUEMA 1- PREPARAÇÃO DO INÓCULO E SEMEADURA NO TESTE DIRETO	160
ESQUEMA 2- PREPARAÇÃO DO INÓCULO E SEMEADURA NO TESTE INDIRETO	161
ESQUEMA 3- DROGAS USADAS NO MB/BACT	162
ESQUEMA 4- DROGAS ESPECIAIS PARA USO NO MB/BACT	163
FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DE REAGENTES PARA TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS	164
FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ACIDIFICADORA PARA TESTE DO PZA (MB/BacT)	165
FICHA 3- LEITURA DO TESTE NO MB/BACT	166

8- CONTROLE DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE MICOBACTERIOLOGIA

8.1- INTRODUÇÃO	169
8.2- RECOMENDAÇÕES GERAIS	169
8.3- EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO	170
8.3.1- AUTOCLAVE	170
8.3.2- CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA (CSB)	171
8.3.2.1- Descontaminação da CSB	171
8.3.3- CENTRÍFUGA	171
8.3.4- CABINE DE EXAUSTÃO QUÍMICA (CEQ)	172
8.3.5- ESTUFA BACTERIOLÓGICA (36° ± 1° C)	172
8.3.6- MICROSCÓPIO	173
8.3.7- COAGULADOR	173
8.3.8- GELADEIRA (2-8°C)	173
8.3.9- FREEZERS (0 A -70°C)	173
8.3.10- BALANÇA ANALÍTICA DE PRECISÃO	173
8.3.11- MB/BACT	174
8.4- VIDRARIA	174
8.5- MANUTENÇÃO DE AMOSTRAS-TIPO DE MICOBACTÉRIAS	174
8.6- TÉCNICAS LABORATORIAIS	175
8.6.1- BACIOSCOPIA	175
8.6.2- MEIO DE CULTURA	175
8.6.3- DESCONTAMINAÇÃO DE ESPÉCIMES	175
8.6.4- TESTE DE SENSIBILIDADE	176
8.6.5- IDENTIFICAÇÃO	176
8.7- BIBLIOGRAFIA	176

ANEXOS

FICHA 1- CONTROLE DE QUALIDADE DA ÁGUA DEIONIZADA	177
FICHA 2- CONTROLE DE ESTERILIZAÇÃO POR AUTOCLAVE	178
FICHA 3- MANIPULAÇÃO NA CSB	179
FICHA 4- CONTROLE DA DESCONTAMINAÇÃO DA CSB	180
FICHA 5- MANIPULAÇÃO NA CEQ	181
FICHA 6- CONTROLE DE TEMPERATURA DA ESTUFA BACTERIOLÓGICA	182
FICHA 7- CONTROLE DE TEMPERATURA DO SOROAGULADOR	183
FICHA 8- CONTROLE DE TEMPERATURA DA GELADEIRA	184
FICHA 9 - CONTROLE DE TEMPERATURA DO FREEZER	185
FICHA 10- CONTROLE DA SOLUÇÃO DE FENOL LÍQUIDO PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEESEN ..	186
FICHA 11- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEESEN ...	187
FICHA 12- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA LOWENSTEIN JENSEN	188
FICHA 13- CONTROLE DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA MIDDLEBROOK 7H9	189
FICHA 14- ÍNDICE DE CONTAMINAÇÃO	190
FICHA 15- CONTROLE DOS REAGENTES PARA TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS	191
FICHA 16- LEITURA DE RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE	192

9- REGISTRO DE EXAMES E FLUXO DE RASTREABILIDADE

9.1- REGISTRO DE INFORMAÇÃO	195
9.2- FLUXO E RASTREABILIDADE DOS EXAMES REALIZADOS	195
9.2.1- FICHA 1 “ESPÉCIME CLÍNICO PARA CULTURA, IDENTIFICAÇÃO E/OU TESTE DE SENSIBILIDADE” ..	195
9.2.2- FICHA 2 “CULTURAS ENCAMINHADAS PARA TESTE DE SENSIBILIDADE E/OU IDENTIFICAÇÃO”	196
9.2.3- FICHA 3 “CULTURAS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE”	196
9.2.4- FICHA 4 “LEITURA E REGISTRO DOS RESULTADOS DE CULTURA”	196
9.2.5- FICHA 5 “LEITURA E REGISTRO DE RESULTADO DE TESTE DE SENSIBILIDADE”	196
9.2.6- FICHA 6 “RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA”	196
9.2.7- FICHA 7 “RESULTADO DE LEITURA DO TESTE DE CRESCIMENTO EM AGENTES INIBIDORES”	196
9.2.8- FICHA 8 “RESULTADO DOS EXAMES DO LABORATÓRIO”	197
9.2.9- FICHAS PARA PEDIDO DE EXAMES	197
9.3- BIBLIOGRAFIA	197
ANEXOS	
FICHA 1- ESPÉCIME CLÍNICO PARA CULTURA, IDENTIFICAÇÃO E /OU TESTE DE SENSIBILIDADE	198
FICHA 2- CULTURAS ENCAMINHADAS PARA:	199
FICHA 3- CULTURAS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE	200
FICHA 4- LEITURA E REGISTRO DOS RESULTADOS DE CULTURA	201
FICHA 5- LEITURA E REGISTRO DE RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE	202
FICHA 6- RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	203
FICHA 7- RESULTADOS DE LEITURA DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS AGENTES INIBIDORES	204
FICHA 8- RESULTADO DOS EXAMES DO LABORATÓRIO	205
FICHA 9- SOLICITAÇÃO DE BACILOSCOPIA E DE CULTURA	206
FICHA 10- SOLICITAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO E/OU TESTE DE SENSIBILIDADE	207

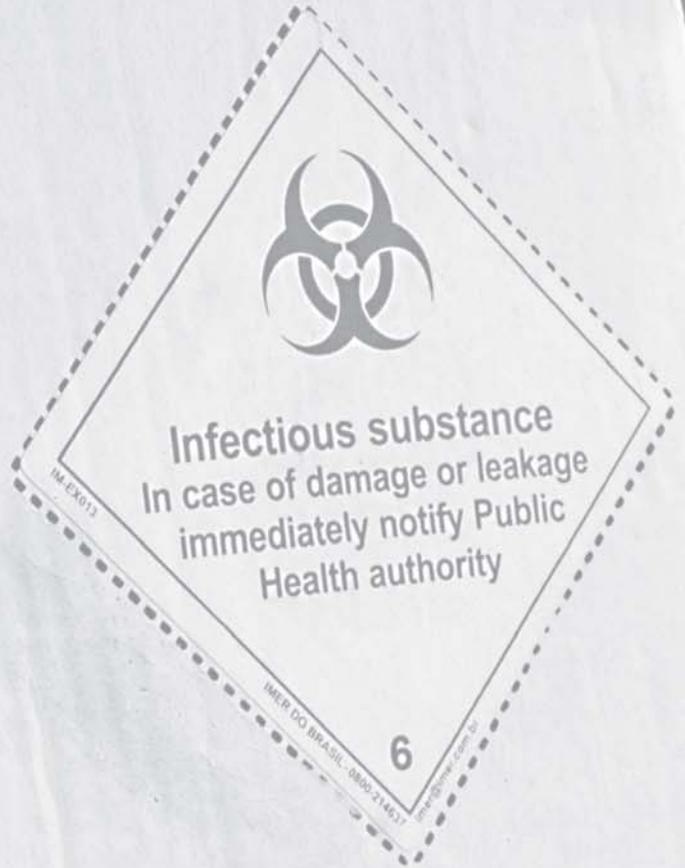
10- SOLUÇÕES E REAGENTES. MATERIAL UTILIZADO NO LABORATÓRIO

10.1- INTRODUÇÃO	211
10.2- SEGURANÇA QUÍMICA	211
10.3- ÁLCOOL ETÍLICO A 70% (3)	211
10.3.1- SOLUÇÃO	211
10.3.1.1- Preparação	211
10.4- ÁLCOOL ETÍLICO A 70% (4)	211
10.4.1- SOLUÇÃO	211
10.4.1.1- Preparação	212
10.5- SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2% (3)	212
10.5.1- SOLUÇÃO	212
10.5.1.1- Preparação	212
10.6- SOLUÇÃO DE ÁLCOOL – IODADO	212
10.6.1- SOLUÇÃO ESTOQUE	212
10.6.1.1- Preparação	212
10.6.1.2- Solução de Uso	212
10.7- SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO, SEGUNDO SOERENSEN (1)	213
10.7.1- PREPARO DAS SOLUÇÕES	213
10.7.1.1. Solução de Fosfato de Sódio M/15	213
10.7.1.2- Solução de Fosfato de Potássio M/15	213
10.7.2- MONTAGEM DO TAMPÃO	213
10.8- ESCALA DE McFARLAND	214
10.8.1- PREPARO DAS SOLUÇÕES	214
10.8.1.1- Solução de Cloreto de Bário a 1%	214
10.8.1.2- Solução de Ácido Sulfúrico a 1%	214
10.8.2- PREPARAÇÃO DA ESCALA	214
10.9- SOLUÇÃO DE HCL 2 N	215
10.9.1- CÁLCULOS	215
10.9.2- PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HCl a 2N (200 ml) ÁCIDO SOBRE A ÁGUA	215

10.10- UNIDADES DE MEDIDA	216
10.10.1- MEDIDAS DE COMPRIMENTO	216
10.10.2- MEDIDAS DE PESO	216
10.10.3- MEDIDAS DE VOLUME	216
10.11- MATERIAL UTILIZADO NO LABORATÓRIO	217
10.11.1- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA	217
10.11.2- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL	217
10.11.2- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL	218
10.11.3- OUTROS EQUIPAMENTOS	218
10.11.4- REAGENTES	219
10.11.5- MEIOS DE CULTURA	220
10.11.6- VIDRARIA	220
10.11.7- OUTROS	221
10.11.8- DESCRIÇÃO DETALHADA DOS PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS	221
10.11.8.1- Cabine de Segurança Biológica	222
10.11.8.2- Pipetador Automático	222
10.11.8.3- Microscópio Binocular	223
10.11.8.4- Geladeira Para Laboratório	223
10.11.8.5- Freezer Para Laboratório	223
10.11.8.6- Centrífuga de Bancada	223
10.11.8.7- Agitador de Tubos	224
10.11.8.8- Autoclave Dupla Porta	224
10.11.8.9- Bico Bunsen	225
10.11.8.10- Estufa de Bancada	225
10.11.8.11- Câmara Para Sorocoagulação	225
10.11.8.12- Sistema de Esterilização de Ar	225
10.12- PREVISÃO DE MATERIAL PARA COLORAÇÃO DE 1.000 LÂMINAS UTILIZANDO O MÉTODO DE ZIEHL-NEELSEN	226
10.12.1- SUBSTÂNCIAS	226
10.12.2- SOLUÇÕES	226
10.13- BIBLIOGRAFIA	226
ANEXOS	
FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO ÁLCOOL ETÍLICO A 70%	227
FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2%	228
FICHA 3- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO ÁLCOOL IODADO	229
FICHA 4- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO	230
FICHA 5- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA ESCALA DE MacFARLAND	231
FICHA 6- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HCl A 2N	232

11- REDE NACIONAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA PARA A VIGILÂNCIA DA TUBERCULOSE

11.1-INTRODUÇÃO	235
11.2 - COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NACIONAL	235
11.3 - COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA REGIONAL	235
11.4- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA ESTADUAL	236
11.5- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA MUNICIPAL	236
11.6- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO LOCAL	237
11.7- COMPETÊNCIAS DOS CENTROS COLABORADORES	237
11.8- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE FRONTEIRA	237
11.9- REQUISITOS DE ELEGIBILIDADE PARA LABORATÓRIOS NOS DIVERSOS NÍVEIS	238
11.10- BIBLIOGRAFIA	239



Capítulo 1

BIOSSEGURANÇA

PART NUMBER
IM-AG-3621
IM-AG-362

335425



4G / CLASS
BR/9101-IMER

1.1- INTRODUÇÃO

O laboratório manipula o agente etiológico da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*) que está classificado como CLASSE III segundo a resolução nº. 1 de 1988 do Conselho Nacional de Saúde, Capítulo X, Artigo 64 e pela Instrução Normativa nº. 7 quando trata da classificação de riscos de organismos geneticamente modificados e que também serve como guia para orientação nas medidas de biossegurança para sua manipulação. As demais espécies desse gênero, que têm apresentado relevância em patologia humana no Brasil, estão incluídas no risco II e são geralmente manipuladas em laboratórios de tuberculose. O CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e o NIH (National Institutes of Health) classificam os laboratórios para diagnóstico clínico e/ou pesquisa de *M. tuberculosis* no nível 3 de biossegurança (NB3), nível onde os agentes patogênicos causam doenças que podem ser fatais e que são transmitidas pela via aerógena.

As precauções sobre segurança, saúde e trabalho compreendem o uso de procedimentos de rotina com normas de conduta bem estabelecidas, para que possam assegurar a validade e a precisão nos resultados, a integridade dos técnicos envolvidos, das instalações físicas, dos equipamentos e da comunidade.

1.2- RISCO DE INFECÇÃO NO PESSOAL DO LABORATÓRIO

Estudos realizados no Brasil e no exterior demonstram que o pessoal da saúde tem o risco de infecção maior que o da população geral e a incidência de tuberculose no pessoal do laboratório, numa instituição de saúde, é três a cinco vezes maior que entre o restante do pessoal. A principal via de infecção é a aérea, pois o indivíduo se infecta através de aerossóis - gotículas dessecadas de material líquido contendo bacilos, com dimensões de 0,3 µm e que ficam em suspensão no ar. Estes aerossóis são produzidos em grau variado pela manipulação no laboratório, desde a abertura de potes de escarro até a quebra de um tubo durante a centrifugação. O risco depende de quantos materiais ele manipula, da concentração de bacilos nesses e das boas práticas de biossegurança adotadas no laboratório.

O pessoal de laboratório de NB3 deve ter um treinamento específico para manipular agentes patogênicos e ser supervisionado por técnicos competentes e com experiência nesse tipo de trabalho. Ao serem admitidos, esses profissionais devem realizar a prova tuberculínica, segundo recomendação das normas de controle da tuberculose.

1.3- COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA E COMITÊ DA QUALIDADE

Essas comissões, formadas por membros do laboratório e outros da Instituição, são formadas para assegurar a manutenção da qualidade do trabalho em bons níveis todo o tempo. A comissão da biossegurança deve ter dois técnicos em comum com o comitê da qualidade. Na composição do comitê da qualidade estão também os chefes pelos setores do laboratório, que estão certificados pelo INMETRO. Todos os procedimentos operacionais padronizados (POPs), o Manual da Qualidade, o Livro de Registro de Ocorrências e outros registros estarão sempre a disposição dos técnicos, nesta setor. Além disso, reuniões periódicas de seus membros vão permitir os ajustes para garantir a qualidade do trabalho.

1.4- GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

O laboratório de tuberculose tem que ter um plano de gerenciamento de resíduos compatível com sua atividade, que vai integrar o processo de gerenciamento ambiental baseados nos princípios da não geração de resíduos e na minimização da geração de resíduos, que podem ser sólidos e líquidos de risco biológico ou não, químicos e aerossóis.

O descarte dos resíduos produzidos em um serviço de saúde estão regulamentados por dispositivos legais que podem ser de âmbito municipal, estadual e federal. As resolução do CONAMA n° 283/2001 define procedimentos para o gerenciamento de resíduos dos serviços de saúde e ainda está em aprimoramento, atualização e complementação.

Os resíduos produzidos pelo laboratório de tuberculose estão classificados no grupo A e B, pois apresentam risco potencial a saúde pública e ao meio ambiente devido a presença de agentes biológicos (A) e produtos químicos (B). As culturas semeadas e descartadas, assim como o material clínico deverão ser autoclavados e rejeitados como resíduos sólidos urbanos. Os reagentes das reações bioquímicas, depois de autoclavados e os corantes precisam ser diluídos e neutralizados para o descarte final no esgoto de águas servidas, segundo interpretação da Resolução RDC ANVISA n° 33/2003.

1.5- RECOMENDAÇÕES GERAIS

1.5.1- PARA O PESSOAL

- não é permitido fumar, comer, beber, nem levar qualquer objeto à boca, aos olhos ou ao nariz nas áreas de contenção do laboratório ou em qualquer outro local que possa pôr em perigo a segurança ou a saúde dos funcionários e instalações;
- nunca pipetar com a boca;
- trabalhar sempre com avental, luvas e máscaras adequados àquele tipo de trabalho, assim como pró-pés, toucas e proteção para barba também podem ser usados. Assim que se deixam as áreas de manipulação, esses equipamentos de proteção individual (EPIs) são colocados em cemitério para esterilização;
- não usar roupa de tecido sintético, facilmente inflamável. Usar calçados fechados de couro ou similar;
- usar óculos de segurança nos laboratórios, onde for obrigatório;
- não colocar materiais de laboratório dentro de seu armário de roupas e não utilizar vidraria de laboratório como utensílio doméstico;
- lavar cuidadosamente as mãos, com bastante água e sabão, antes de tomar qualquer refeição;
- não colocar nenhum alimento nas bancadas, armários e geladeiras dos laboratórios;
- lentes de contato devem ser evitadas, pois podem ser danificadas por produtos químicos, causando lesões graves; assim como é proibido manipular usando anéis, relógios, pulseiras etc;
- não se expor a radiações ultravioleta, infravermelha ou de luminosidade muito intensa, sem proteção (óculos com lentes filtrantes);
- deve ser proibido testar amostras ou reagentes pelo gosto e pelos odores;
- brincadeiras grosseiras são absolutamente proibidas nos laboratórios;

- pessoas com cabelos compridos deverão prendê-los atrás da cabeça, ou usar algum tipo de gorro ou touca; a barba deve ser mantida curta;
- É proibido trabalhar sozinho; uma outra pessoa serve como apoio para quem está manipulando, principalmente se houver um acidente;
- manter em todos os momentos uma atitude calma e cuidadosa. Devem-se usar sempre material e equipamentos adequados;
- É proibido o uso de equipamentos sonoros. Os funcionários de áreas críticas precisam estar atentos a qualquer ruído estranho à sua volta, principalmente dos equipamentos que estejam operando.

1.5.2- REFERENTES AO LABORATÓRIO

- manter as bancadas sempre limpas e livres de materiais estranhos ao trabalho;
- rotular imediatamente qualquer reagente ou solução recém-preparados, colocando a data da preparação e o prazo de validade;
- as amostras ou culturas recebidas devem ser imediatamente identificadas;
- o acesso de visitantes ao laboratório deve ser restrito. Caso haja visitas, elas devem ser acompanhadas por um membro da equipe de trabalho e devem usar avental, proteção de pés e cabeça; nunca permitir a presença de visitas na áreas de manipulação, assim como crianças em laboratórios;
- descartar vidrarias lascadas ou trincadas em recipientes assinalados e lacrados, assim como agulhas e seringas, para serem recolhidos por pessoal da coleta de lixo urbana especializado;
- utilizar sinais de advertência apropriados quando condições perigosas puderem ocorrer;
- sinalizar portas de salas de manipulação de agente etiológico e de manipulação e estocagem de produtos químicos com os avisos internacionais que serão apresentados anexos.

1.6- SEGURANÇA BIOLÓGICA

Todo o material contaminado recebido na recepção deverá ser registrado e transportado em carrinho, em caixas de aço, fechadas com tampa, para ser classificado e armazenado em geladeiras, para processamento posterior.

A manipulação deste material deverá ser feita em área NB3, com técnica asséptica apropriada e EPIs e equipamentos de proteção coletiva (EPCs) compatíveis (BARREIRAS PRIMÁRIAS).

1.6.1- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPIs)

- avental descartável de mangas compridas, com punho sanfonado, sem botões, amarrado atrás, fabricado com tyvek. Esse equipamento deverá ser colocado no vestiário contíguo à área NB3, após a retirada das roupas sociais, e deverá ser descartado ao término do trabalho, num cemitério, imediatamente à saída da área NB3, passando pela barreira de contenção, quando o técnico se encaminhar para o banho. O pró-pé, a touca etc. deverão ser do mesmo material e colocados e retirados da mesma maneira.

- luvas de látex sem talco para manuseio de qualquer material na área NB3, que deverão ser retiradas e colocadas no cemitério na mesma ocasião da retirada do avental. Para as pessoas alérgicas ao látex, as luvas deverão ser de vinil ou nitrila.
- é importante verificar se os EPIs têm CA (Certificado de Autorização dado ao fabricante pelo Ministério do Trabalho);
- os respiradores devem ter qualidade similar a N95 ou N99.

1.6.2- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA (EPCS)

- cabine de segurança biológica classe II, B2 ou B3 (ver figura 1);
- cabine de exaustão de gases;
- centrífuga com rotor fechado (“aerossol free”);
- pipetador automático;
- autoclave de dupla porta;
- cemitérios de aço inoxidável;
- extintores de incêndio;
- chuveiro de emergência;
- lava-olhos;
- estantes e porta-tubos de aço inoxidável;
- carrinhos de aço inoxidável;
- caixas de aço inoxidável para transportar culturas e espécimes.

1.6.3- ANTI-SÉPTICOS E DESINFETANTES

As soluções anti-sépticas mais utilizadas são o álcool etílico a 70%, o álcool-iodado ou uma solução degermante à base de polivinil-iodo-pirrolidona (PVPI), adquirida no comércio. Podem ser utilizadas após a retirada das luvas ou, se houver algum respingo de material contaminado na pele. Para a desinfecção de bancadas e artigos recomenda-se solução de hipoclorito de sódio com 2% de cloro livre, recém-preparada a partir de uma solução concentrada (como a de 5% de cloro livre), deixando em contato por pelo menos 30 minutos. Para as bancadas que sofrem com a ação do hipoclorito de sódio, a desinfecção pode ser feita com o álcool etílico a 70%.

1.6.4- COMO PROCEDER EM CASO DE ACIDENTE

Um dos mais graves acidentes que ocorrem no laboratório é a quebra de um tubo contendo cultura líquida, pela grande formação de aerossóis. Em qualquer caso de quebra de frasco contaminado, deve-se abandonar imediatamente o recinto para permitir que os aerossóis se assentem. Depois de transcorridos 30 minutos, retirar o tubo e os restos da cultura com a ajuda de uma pá de metal e de uma pinça e colocar o conteúdo em cemitério com tampa. Cobrir o local com papel absorvente para fazer a contenção do material líquido que derramou e colocar solução de hipoclorito de sódio a 2% de modo que o o papel fique embebido, mas que não

escorra. Deixar agir por 30 minutos. Depois desse tempo, retirar o papel e colocar no cemitério. Lacrar e rotular avisando da presença de cacos de vidro, para o pessoal da lavagem não se ferir quando for abrir para descarte. Esterilizar a 121°C por 20 minutos. Usar luvas, máscara e avental para realizar esta operação. Mesmo com as mãos enluvadas use uma vareta de madeira ou pinça de aço inox para recolher os cacos. Não tente pegá-los com as mãos, pois poderá se cortar e se contaminar por perfuração, que é um acidente mais grave ainda. Ao manusear material contaminado contido em seringas, observar a regra principal, que é a de não colocar a mão oposta à da seringa no frasco antes de introduzir a agulha para aspirar ou inocular suspensões, e sim logo após.

Ex: Antes de coletar suspensão num tubo 13x100mm de rosca, abrir a tampa com a mão esquerda primeiramente. Introduzir a seringa dentro do tubo, e somente depois segurar o tubo para completar a aspiração com segurança. Para inocular, repetem-se esses mesmos cuidados. As seringas devem ser desprezadas num frasco de boca larga, com tampa de rosca, contendo hipoclorito de sódio a 2%, colocando a agulha para baixo. Nunca tentar colocar a capa da agulha de volta. Nunca tentar pegar a seringa de volta. Esse material (vidro + seringas), após esterilização a 121°C em autoclave, é descartado na coleta seletiva de lixo urbano para material hospitalar.

1.7- PROJETO ARQUITETÔNICO DO LABORATÓRIO (BARREIRA SECUNDÁRIA)

Todo laboratório deve ser projetado de acordo com normas e padrões de segurança biológica, química, ergonômica etc., com especial atenção à contaminação do pessoal, a perigos com incêndios e explosões e tratamento de rejeitos biológicos, químicos, radioativos etc. Os aspectos a serem considerados no projeto, relacionados com segurança, são a instalação de:

- áreas de manipulação de Nível de Biossegurança 3 (NB3) com barreiras de contenção apropriadas;
- áreas de manipulação NB2, laboratório químico;
- sala de recepção e armazenamento de amostras clínicas e culturas de microrganismos;
- vestiários e banheiros para troca de roupas para manipulação;
- fluxos de material e pessoal dentro do laboratório;
- sistema de comunicação interna, rede de computadores e software para controle de aparelhos, material e exames realizados;
- um sistema para detecção, extinção prematura de incêndio;
- sala de estocagem de reagentes por categoria de perigo;
- portas à prova de fogo nas salas de manipulação e estocagem química;
- luzes de emergência e gerador;
- uso de aparelhos à prova de explosão (geladeira, freezer etc);
- Cabines químicas controladas por válvulas e interruptores instalados fora da mesma e cabines de segurança biológica classe II B2 para manipulação de material contaminado;
- chuveiros e lava-olhos;
- áreas e fluxos apropriados a coleta, armazenamento e processamento de rejeitos biológicos, químicos, etc.

1.8- SEGURANÇA QUÍMICA

Ao iniciar um trabalho em que sejam manipulados produtos químicos é importante conhecer procedimentos de segurança que permitam uma atuação com um mínimo de riscos. As regras de segurança funcionam melhor se as pessoas conhecem os equipamentos e métodos empregados. É necessário certificar-se de que os envolvidos entendem o significado das normas de segurança, para criar atitudes uniformemente corretas no laboratório. Além do que é importante um planejamento prévio. Um trabalho que não foi submetido a um planejamento gera situações de risco, além de causar prejuízos.

1.8.1- MANIPULAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS

1.8.1.1- Produtos Tóxicos

A manipulação de produtos tóxicos em laboratório é inevitável e pode ser feita com elevado grau de segurança, desde que se reconheça a toxicidade do produto que vai ser manipulado. Na tabela 2 anexa -“Substâncias químicas, classificação e incompatibilidades”- apresentamos os principais produtos químicos utilizados num laboratório de tuberculose, como são classificados e como devem ser manipulados:

- não manipular produtos tóxicos sem se certificar da toxicidade de cada um deles e dos mecanismos de intoxicação;
- trabalhar com produtos tóxicos somente na cabine;
- não jogar qualquer produto tóxico nas pias sem o devido cuidado;
- evitar o contato de produtos tóxicos com a pele.

Interromper o trabalho imediatamente caso tenha qualquer sintoma de intoxicação. Dirigir-se ao ambulatório médico, acompanhado, e informar sobre as características do produto envolvido.

1.8.1.2- Produtos Corrosivos

Líquidos corrosivos são responsáveis também por incêndios, quando postos em contato com a matéria orgânica e/ou determinados produtos químicos.

- só manipular produtos corrosivos usando óculos de segurança e luvas de PVC;
- não jogar produtos corrosivos concentrados na pia. Eles só podem ser descartados depois de diluídos;

Tomar os seguintes cuidados para diluir produtos corrosivos:

- verter o diluído e nunca o contrário;
- fazer a diluição lentamente em proporção mínima de 1:1000;
- usar bastão de vidro para homogeneização.

1.8.1.3 - Produtos Químicos Especiais (peróxidos, cloratos, percloratos, nitratos, etc.)

Peróxidos pertencem a uma classe especial de compostos químicos, que apresentam problemas especiais de estabilidade e periculosidade potencial. São classificados entre os compostos mais perigosos normalmente mais utilizados em laboratório. Alguns peróxidos manipulados em laboratório são mais sensíveis ao choque do que o TNT.

Outras classes de produtos químicos, como os cloratos, percloratos e nitratos também apresentam periculosidade devido a sua sensibilidade ao impacto, à luz e à centelha.

- não usar espátula de metal para manipular peróxidos;
- não retornar ao frasco original qualquer quantidade de peróxido ou compostos formadores de peróxidos não utilizados;
- não jogar peróxidos puros na pia. Eles devem ser altamente diluídos para isso; resfriar soluções com peróxidos abaixo da temperatura de congelamento dos mesmos. Na forma cristalina, eles são mais sensíveis ao choque;
- absorver imediatamente com vermiculite soluções de peróxidos derramados.

1.8.1.4- Produtos Pirofóricos

São aqueles que, em condições ambientais normais (atmosfera, temperatura e umidade), reagem violentamente com o oxigênio do ar ou com a umidade existente, calor, gases inflamáveis e fogo. Dentre estes, podem-se citar metais alcalinos e alguns derivados organo-metálicos.

- lítio, sódio e potássio (metais alcalinos) são sólidos. Devem ser manipulados sob um líquido inerte, geralmente querosene, sob o qual vêm imersos. Exposição prolongada ao ar provoca ignição espontânea;
- não jogar aparas de metais alcalinos na pia, eles provocam incêndio. Conservá-las longe da água;
- conservar os produtos pirofóricos sólidos longe de solventes inflamáveis, a fim de evitar propagação do fogo;
- alguns derivados organo-metálicos são líquidos. São adicionados em recipientes metálicos, munidos com uma válvula. A manipulação destes produtos só deve ser feita sob a orientação do químico responsável;
- nunca abrir a válvula para a atmosfera. Os recipientes só devem ser abertos para uma atmosfera de gás inerte (nitrogênio ou orgânico) seco, ou uma câmara seca, também provida de gás inerte;
- transferir esses produtos diretamente sobre o solvente que será utilizado durante a reação, para diminuir o perigo de incêndio. Os mesmos, quando diluídos, tornam-se menos inflamáveis;
- nunca utilizar água para apagar o incêndio. Usar extintor de pó químico seco ou areia.

1.8.1.5- Cilindros de Gás Comprimido

- não solicitar a instalação de cilindros de gás comprimido dentro do laboratório, sem autorização prévia do responsável;
- manter os cilindros instalados sempre presos por correntes; Não permitir que sejam instalados cilindros de gás comprimido sem identificação;
- providenciar a remessa dos cilindros vazios para local adequado;
- certificar se o capacete de proteção está bem roscado, antes de movimentar um cilindro de gás comprimido;
- não transportar cilindros de gás comprimido, cheios ou vazios, sem o uso de carrinhos apropriados;
- conservar os cilindros de gás comprimido, quando fora de uso, cheios ou vazios, com o capacete de proteção.

1.8.1.6- Armazenamento de Produtos Químicos

Devem ser seguidos critérios rígidos para o armazenamento de produtos químicos variados. Deve-se levar em conta que produtos químicos podem ser voláteis, tóxicos, corrosivos separados por famílias com distâncias de 0,5 a 1,0 metro.

- o local de armazenamento de produtos químicos deve ser amplo, bem ventilado, com exaustão, com duas saídas, dotado de prateleiras seguras e largas;
- as instalações elétricas devem ser à prova de explosão. Não se deve permitir estocar produtos não identificados;
- deve-se promover a verificação dos prazos de validade dos produtos e descartar os vencidos;
- não se deve armazenar vidraria juntamente com reagentes;
- devem-se estocar produtos separados por famílias, com distâncias de 0,5 a 1,0m.

Devem-se reforçar os cuidados com produtos corrosivos, explosivos e peroxidáveis. Os corrosivos, ácidos e bases devem ficar em armários e prateleiras próximos do chão, se possível com exaustão. O mesmo pode-se dizer para os inflamáveis e explosivos, que devem manter grande distância em metros de produtos oxidantes. Sinalizar as prateleiras, armários com os pictogramas alusivos a cada grupo de substância (ver figura 2 “Pictogramas Indicativos do Tipo de Periculosidade dos Reagentes”).

1.8.1.7- Derramamentos Acidentais de Produtos Químicos

Embora os derramamentos involuntários de produtos químicos não sejam freqüentes no laboratório, algumas precauções se fazem necessárias, principalmente quando se trabalha com produtos de alta toxicidade. Em caso de derrame, recomenda-se:

- isolar a área e comunicar a todos que estão no laboratório;
- comunicar o responsável pela segurança;
- proteger-se com máscara de respiração, luvas, óculos e outros EPIs adequados;
- apagar as chamas;
- desligar aparelhos, aquecedores elétricos, estufas, muflas, etc.;
- permitir ventilação e/ou exaustão no ambiente;
- adicionar um absorvente tipo terra diatomácea ou Ca(OH)_2 em caso de ácidos, terra diatomácea no caso de álcalis e carvão ativo para solventes orgânicos;
- remover com uma pá a massa resultante em sacos plásticos ou recipientes metálicos convenientes, caso o produto reaja ou dissolva o plástico;
- providenciar a limpeza do local e deixar ventilar até não haver mais vapores residuais no ar.

1.8.2- EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA E EMERGÊNCIA

Os equipamentos de segurança, tanto os de proteção coletiva (EPCs), como os de proteção individual (EPIs), devem estar disponíveis para os usuários dos laboratórios, assim como devem ser oferecidas instruções para seus usos. Ver tabela 1 e 2 “Substâncias Químicas Perigosas e Uso de EPIs”. Os EPCs vão eliminar ou minimizar os riscos, beneficiando a todos os funcionários e o ambiente.

1.8.3- EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO COLETIVA

1.8.3.1- Cabines de Exaustão de Gases

Com bancada em aço inox permitem que sejam executadas todas as tarefas de laboratório em condições adequadas de salubridade.

1.8.3.2- Chuveiro de Emergência

Todo laboratório deve ser equipado com chuveiro, localizado próximo à área de manipulação e ser fácil e rapidamente alcançado. Tanto o chuveiro quanto a área adjacente deverão estar desimpedidos e prontos para utilização a qualquer momento. O chuveiro deve ser de fácil manejo e ter boa vazão d'água.

1.8.3.3- Lavador de Olhos

Como as operações laboratoriais requerem observação e controle contínuos, é possível ocorrerem respingos no rosto e olhos dos laboratoristas, em virtude da proximidade deles com os reagentes. Daí a importância dos lavadores de olhos perto da área de manipulação e junto ao chuveiro, devendo ser possível o funcionamento de ambos ao mesmo tempo.

1.8.3.4- Extintores de Incêndio

Os extintores mais usados em laboratório são do tipo CO₂ ou Pó Químico, que são utilizados no controle dos incêndios classe B e C, que correspondem aos inflamáveis e eletricidade, respectivamente. (Consular Tabela 3 anexa)

1.8.4- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

1.8.4.1- Aventais

São utilizados para proteger as roupas e fornecer proteção adicional ao corpo. Devem apresentar as seguintes características:

- a melhor opção é a seleção de aventais de puro algodão, que não é reativo a muitos produtos químicos e é resistente à chama;
- cobrir completamente as vestimentas;
- ser fechado nas costas, conferindo maior proteção ao operador;
- ser desprovido de bolsos;
- ter mangas compridas;
- aventais de borracha protegem o corpo do pessoal envolvido com a manipulação de grandes volumes de soluções. Para o pessoal responsável pela lavagem, limpeza de vidrarias e equipamentos o uso é obrigatório.

1.8.4.2- Luvas

As luvas oferecem proteção contra riscos biológicos, contra queimaduras químicas, calor ou frio excessivos, cortes e outros riscos físicos. Além disso as luvas fornecem um elevado grau de proteção contra dermatites. Um teste simples para verificar a eficiência de uma luva na proteção contra um determinado material é encher parcialmente a luva com a substância-teste e pendurá-la em uma cabine por 24 horas. Após esse tempo verificar se ocorreu corrosão e avaliar o grau de proteção que se poderá esperar. Existem vários tipos de luvas de proteção, uma para cada finalidade, mas todas devem apresentar as seguintes características: alta resistência; baixa permeabilidade; boa flexibilidade para permitir manter o tato e segurar com firmeza. Os principais usos:

- manipulação de solventes e reagentes químicos;
- manipulação de recipientes com temperaturas extremas: fornos, autoclaves, freezer.

1.8.4.3- Botas de Segurança

São destinadas a proteger os pés e membros inferiores de impacto, perfurações, queimaduras, choques, etc.

1.8.4.4- Óculos de Segurança e Protetores Faciais

A utilização de óculos de segurança e protetores faciais é recomendada quando da execução de procedimentos envolvendo a possibilidade de respingos de reagentes químicos, de emissão de vapores e de ocorrência de refluxos.

1.8.4.5- Máscara de Proteção Respiratória

Essas máscaras são usadas em operações que envolvem a geração de vapores tóxicos. Desse modo, é necessário primeiramente conhecer os vapores que são gerados nos trabalhos do laboratório e as concentrações que determinam o limite de exposição a esses vapores, para depois procurar uma firma especializada em equipamentos desse tipo para aquisição.

- máscara semifacial com dois filtros: os filtros devem ser substituídos quando se observar um aumento na resistência à respiração e sempre no período de validade especificada pelo fabricante;
- máscara semifacial descartável: seu uso é muito difundido em locais onde ocorrem grandes concentrações de material particulado.

1.8.4.6- Mantas Corta-Fogo

Estas mantas são utilizadas em casos de incêndio onde ocorre derramamento de líquidos, e tenha ocorrido derramamento de líquidos inflamáveis nas roupas dos operadores.

1.8.5- PROCEDIMENTOS EM SITUAÇÕES DE EMERGÊNCIA

1.8.5.1- Recomendações Gerais

- devem-se conhecer muito bem as características dos reagentes com respeito à sua toxicidade, inflamabilidade e explosividade antes de utilizá-los;
- as substâncias inflamáveis devem ser manejadas em locais distantes de fontes de aquecimento;
- os cilindros de gás devem ser amarrados com correntes ou protegidos antes das tampas de proteção serem removidas;
- devem-se tomar precauções especiais quando se trabalha com substâncias reconhecidas ou com potencial carcinogênico, tais como asbesto em todas as suas formas, benzeno, clorofórmio, hidrazina e aminas;
- limpar imediatamente qualquer derramamento de produtos químicos. Proteger-se, se necessário, para fazer essa limpeza e usar os materiais e os recursos adequados. Para produtos de petróleo, absorver o material derramado com estopa, que deve ser descartada em vasilhame destinado a material inflamável. No caso de ácidos e bases fortes, o produto deve ser neutralizado antes de se proceder à limpeza. Em caso de dúvida sobre a toxicidade e os cuidados especiais em relação ao produto derramado, consultar tabela no final do capítulo.

EM CASO DE DERRAMAMENTO DE LÍQUIDOS INFLAMÁVEIS, PRODUTOS TÓXICOS OU CORROSIVOS, TOMAR AS SEGUINTE PROVIDÊNCIAS:

- interromper o trabalho;
- advertir as pessoas próximas sobre o ocorrido;
- solicitar ou efetuar a limpeza imediata;
- alertar seu supervisor;
- verificar e corrigir a causa do problema;
- o pessoal de apoio que é responsável pela limpeza geral do laboratório deve receber, por parte dos funcionários, todas as informações pertinentes ao procedimento de limpeza;
- frascos contendo substâncias químicas e equipamentos não podem ser movimentados por esse pessoal. Outro ponto a considerar é quanto ao descarte de frascos vazios de substâncias químicas. Os mesmos devem sofrer um tratamento prévio de limpeza e ser depositados em locais próprios e protegidos para que não sejam utilizados para outras finalidades.

Todo laboratório significa área de risco que pode ser minimizado por um bom gerenciamento, treinamento e uso de equipamentos de proteção adequados. Deve-se ter um plano por escrito que abranja fogo, combate a incêndios e instruções para evacuação, elaborado pelo grupo de combate ao fogo e para outras emergências elaborado pelo grupo de laboratório. Pequenos incêndios em bancadas são emergências das mais comuns e na maioria das vezes podem ser extintos pelo pessoal do laboratório. Contudo, numa situação de incêndio, antes de se tentar extingui-lo deve-se chamar o Corpo de Bombeiros, uma vez que qualquer incêndio, não importando sua dimensão, pode-se alastrar com uma rapidez inesperada.

Ações imediatas podem consistir no uso de cobertores contra fogo ou de extintores adequados, enquanto o responsável (coordenador da biossegurança) deve reavaliar a situação e decidir se continua combatendo o fogo ou se é necessário evacuar o prédio e chamar o grupo de combate a incêndios.

Todos os usuários do laboratório devem conhecer o plano de combate ao fogo e de evacuações e ser treinados a executar as tarefas que lhes forem designadas. O treinamento deve ser conduzido pelo menos duas vezes ao ano, devendo os participantes avaliar por escrito o treinamento e o plano, indicando as correções necessárias.

O plano deve incluir mapas de evacuações dos prédios com indicações das portas de saída apropriadas e deve ser fixado em vários locais bastante comuns e visíveis. Listas de telefones de emergência (médicos, hospitais, ambulâncias, Corpo de Bombeiros e outros) devem ser afixados próximos de cada telefone e mantidos atualizados.

Os equipamentos de segurança dos laboratórios requerem verificações regulares para assegurar que estão em locais apropriados e que funcionam adequadamente (ver instruções do fabricante).

Todo laboratório deve ter pessoas treinadas em primeiros socorros e em ressuscitação cardiopulmonar, em número suficiente para assegurar as suas presenças durante todo o tempo de trabalho.

Devem-se preparar relatórios de todos os acidentes nos quais ocorreu injúria, ou houve a possibilidade de injúria, incidentes ou “quase acidentes” por questões de segurança, como documento para possíveis investigações e para rever as medidas preventivas e a educação em segurança dos usuários do laboratório.

1.8.5.2- Incêndio: Fontes, Classes e Combate

As principais fontes causadoras de incêndio no laboratório são:

- equipamentos elétricos mal conservados, mal operados ou conectados em rede elétrica errada;
- sobrecarga da rede elétrica por conectar vários aparelhos;
- operação indevida com líquidos inflamáveis, cilindros de gás ou nas tubulações;
- estocagem de líquidos inflamáveis e voláteis em refrigeradores cujo sistema elétrico de partida produza faíscas;
- substâncias químicas explosivas ou relativas: ex.: ácido perclórico, quando em contato com madeira, ladrilhos ou tecido, explode. Ácido pícrico e os picratos detonam pela ação do calor e dos impactos;
- agentes oxidantes: as substâncias oxidantes são capazes de gerar incêndios quando em contato com outras substâncias ou material combustível.

Os incêndios são agrupados em 4 classes, com medidas particulares de controle e combate (ver tabela 3):

CLASSE A: Materiais de fácil combustão e que deixam resíduos, como tecidos, madeiras, papéis, fibras, etc. Nesse caso utilizar água e espuma para combater o fogo. Se o fogo estiver no início, pode-se utilizar pó químico seco ou gás carbônico.

CLASSE B: Produtos que queimam somente na superfície e não deixam resíduos, como vernizes, solventes, etc. O controle pode ser feito por abafamento, com gás carbônico, pó químico e espuma.

CLASSE C: Ocorre em equipamentos elétricos energizados, como motores, transformadores, quadros de distribuição, etc. Utilizar no controle, extintores de gás carbônico, pó químico seco. Com a corrente desligada, combater este incêndio como se fosse das classes A ou B.

CLASSE D: Inclui produtos pirofóricos como o magnésio, zircônio, titânio, etc. Combater por abafamento, com pó químico especial, limalha de ferro fundido ou areia.

1.9- BIBLIOGRAFIA

- 1- BRASIL. Instrução normativa n. 7 de 06 de junho de 2003. Dispõe sobre as normas para o trabalho em contenção com organismos geneticamente modificados. Diário Oficial da União, Brasília, p.11827, de 09 junho de 1997, Seção 1.
- 2- BRASIL. Resolução n. 283 de 12 de julho de 2001. Dispõe sobre o tratamento e a destinação final dos resíduos dos serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, p. de 01 de outubro de 2001, Seção 1.
- 3- BRASIL. Resolução n. 306 de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, p. 49, de 10 de dezembro de 2004, Seção 1.
- 4- CARVALHO, PR. Boas Práticas Químicas em Biossegurança. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência Ltda; 1999.
- 5- LACEN PR- Manual de Biossegurança e Segurança Química em Laboratório de Saúde Pública, Curitiba, 2000.
- 6- Oxford University - Chemical Resistant gloves guide.

<http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/glovesbymaterial.html>

7-Pereira, JDM- Boas práticas para laboratório, Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro,
 8- Teixeira P, Valle S. Biossegurança. Uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996.
 9-UNESP - Guia de neutralização de resíduos químicos, 2002

<http://www.ibilce.unesp.br/servicos/prevencao/protocolo.htm>

10-US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health - Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4 ed. Washington: CDC, 1999.

FIGURA 1- CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA CLASSE II - BII

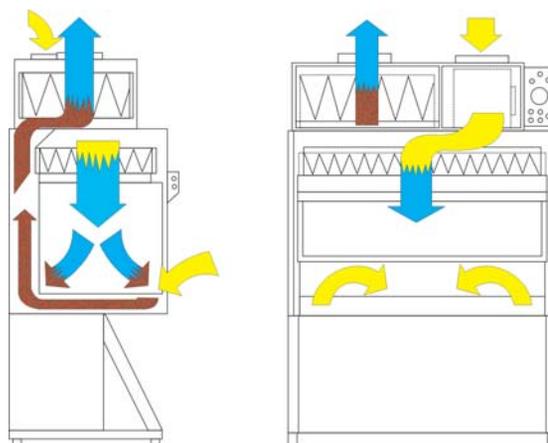


FIGURA 2- PICTOGRAMAS INDICATIVOS DO TIPO DE PERICULOSIDADE DOS REAGENTES



TABELA 1- SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS PERIGOSAS E USO DE EPIs

SUBSTÂNCIA	LUVAS	MÁSCARA	AVENTAL/ÓCULOS	EM CASO DE ACIDENTE
ÁCIDO CLORÍDRICO	PVA/Borracha natural	respirador semifacial em silicone/7252 - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água
ACIDO FOSFÓRICO	Borracha natural/nitrílica	respirador semifacial em silicone/7252 - 3M	Óculos com Avental de TYVEK BR	Lavar com água com sabão absorver com mantas e/ ou areia de argila
ACETONITRILA	PVA/Borracha natural	respirador semifacial em silicone/7200 S - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	
ACRILAMIDA	PVC/Borracha butílica		Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água e sabão e / ou lavagem gástrica
BROMETO DE ETÍDIO	Borracha nitrílica		Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água corrente induzir o vômito
CORANTES DERIVADOS DA ANILINA	borracha butílica	respirador semifacial para poeira, névoa e fumos		Lavar com água e sabão
CLOROFÓRMIO	PVA/neoprene	respirador semifacial em silicone/7200 S - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água corrente
DMSO	Borracha natural			
ETILENO GLICOL	Borracha natural/nitrílica		Avental de TYVEK BR	Utilizar álcool etílico lavar com água
FENOL	PVA/Borracha natural	respirador semifacial em silicone/7200 S - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água e sabão, beber leite
FORMALDEÍDO	PVC/Borracha natural	respirador semifacial em silicone/7252 - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água corrente
HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO/SÓDIO	Borracha nitrílica	respirador semifacial para poeira, névoa e fumos		Lavar com água e sabão e absorver material com mantas e areia
HIPOCLORITO DE SÓDIO a 5%	Borracha nitrílica		Óculos com Avental de TYVEK BR	
IODO	Borracha nitrílica		Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água corrente e absorver o material com areia
MERCURIO	Borracha nitrílica		Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com sabão especial que brilha enquanto houver material
METANOL	Borracha natural	respirador semifacial em silicone/7200 S - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Utilizar álcool etílico
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 30%	PVA/Borracha natural		Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Lavar com água e absorver com mantas e areia
PROPILENO GLICOL	Borracha natural/nitrílica		Avental de TYVEK BR	
SULFATO DE MAGNÉSIO		respirador semifacial para poeira névoa e fumos,	Avental de TYVEK BR	Utilizar água corrente
TRIS			Avental de TYVEK BR	Utilizar água corrente
URÉIA			Avental de TYVEK BR	Utilizar água corrente
XILOL	PVA/Borracha nitrílica	respirador semifacial em silicone/7200 S - 3M	Óculos com válvula Avental de TYVEK BR	Utilizar água corrente e sabão

TABELA 2- SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS, CLASSIFICAÇÃO E INCOMPATIBILIDADE

SUBSTÂNCIA	GRUPO	INCOMPATIBILIDADE	EM CASO DE ACIDENTE
ÁCIDO CLORÍDRICO	Irritante / Nocivo	Cianetos, Sulfatos, Formaldeído, Bases Fortes, Metais, Óxidos e Hidróxidos.	Cubra o líquido derramado com uma mistura 1:1:1 por peso de Carbonato de Sódio ou Carbonato de Cálcio, areia de gato de argila (bentonita) e areia.
ACIDO FOSFÓRICO	Corrosivo	Base Fortes, Clorato, Nitrato e Carbeto de Cálcio	Cubra o vazamento com Carbonato de Cálcio ou Carbonato de Sódio, areia de gato de argila (bentonita) e areia , na proporção de peso 1:1:1.
ACETONITRILA	Tóxico	Ácidos, Nitratos, Percloratos, Sódio e Potássio.	
AGAROSE	Irritante Inflamável	Oxidantes	
BROMETO DE ETÍDIO	Irritante	Oxidantes Fortes	Absorva o brometo de etídio com carvão ativado (1mg/ml) e encaminhe o carvão para o entreposto de lixo químico
CLOROFÓRMIO	Irritante/Tóxico Narcótico Inflamável	Alumínio; Pó de Magnésio, Sódio, Potássio, Acetona. Metanol	Cubra o líquido derramado com uma mistura 1:1:1 por peso de Carbonato de Sódio ou Carbonato de Cálcio, areia de gato de argila (bentonita) e areia e transfira para o recipiente apropriado e rotule para incineração
FENOL	Narcótico Tóxico Corrosivo	Alumínio/ Cloreto/ Acido Nítrico/ Hipoclorito de Cálcio	
FORMALDEÍDO	Irritante/Tóxico	Peróxidos/Oxidantes Fortes/ Bases Fortes e Ácidos.	
HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO/SÓDIO	Corrosivo Cáusico para os olhos	Água/ Ácidos/ Alumínio/ Zinco/ Hidrocarbonetos e Halogenados	Neutralize com ác. hidrolórico 5% e escoe pelo ralo. lave totalmente o local com água.
HIPOCLORITO DE SÓDIO	Irritante Corrosivo	Feniacetoneitrila/ Amônia/ Ác. Fortes	
IODO	Corrosivo	Acetileno/ Amônia/ Hidrogênio/ Amoniaco	
MERCÚRIO	Tóxico Narcótico	Amônia/ Ácido Oxálico/ Hidrogênio/ Acetileno	Utilizar um tubo capilar conectado a uma bomba para sugar gotas de mercurio e tratar com kit merconvap
METANOL	Irritante/Tóxico Inflamável		Cubra o vazamento com carbonato de sódio , areia de gato de argila (bentonita) e areia, na proporção de peso 1:1:1 deixe um repouso até que os sólidos assentem, despeje o líquido no ralo e trate o sólido como resíduo normal. do contrário, embale o sólido e rotule-o para incineração.
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 30%	Corrosivo	Cobre/ Permanganato de Cálcio/ Anilina/ Bromo/ Cromo/ Ferro/ Metais e Combustíveis	Cubra o líquido derramado com uma mistura 1:1:1 por peso de carbonato Na ou de Ca, areia de gato de argila (bentonita) e areia. Descarte o líquido pelo ralo.
SULFATO DE MAGNÉSIO	Irritante Narcótico	Cálcio/ Estrôncio/Fosfatos/ Álcool Etóxi-etil	
TRIS	Irritante	Cobre/ Alumínio/Metal	
XILOL	Narcótico Inflamável	Oxidantes fortes e Ácidos	Desligue todas as possíveis fontes de ignição. cubra o vazamento com Carbonato de Sódio ou de Cálcio, areia de gato de argila (bentonita) e areia, na proporção de 1:1:1
ÁCIDO SULFÚRICO	Irritante Corrosivo	Nitratos/ Acetona/ Permanganato de Cálcio/ Clorato de Cálcio/ Perclorato de Cálcio	Cubra o vazamento com Carbonato de Sódio ou de Cálcio areia de gato de argila (bentonita) e areia, na proporção de peso 1:1:1
COLORO	Corrosivo	Amoniaco/Acetileno/ Hidrogenio/Benzina e derivados de petróleo	
ACRILAMIDA	Irritante/Tóxico Explosivo Eratógeno Cancerígeno	Ácidos/Bases/Oxidantes, Ferro/Cobre/ Alumínio/ Metal e Sais de Ferro	
ETILENO GLICOL	Tóxico Inflamável	Ácido.Perclórico/ Peróxido de Sódio/Permanganatos de Potassio e Nitratos	
PROPILENO GLICOL	Irritante/Tóxico Inflamável	Ácido Clorídrico/ Clorofórmio	
DICLOROMETANO	Nocivo Narcótico Cancerígeno Mutagenico	Alumínio/Titânio/Metais alcalinos,algumas formas de plásticos	
ANILINA	Cancerígeno	Ácido Nítrico/ Peróxido de Hidrogênio / Oxidantes	

TABELA 3- TIPOS DE EXTINTORES DE INCÊNDIO E SUA UTILIZAÇÃO

TIPOS DE EXTINTORES	UTILIZAR EM	NÃO UTILIZAR EM
EXTINTORES DE ÁGUA	Fogo em papel e madeira	Equipamentos elétricos, inflamáveis e metais em combustão
EXTINTORES DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO ₂)	Líquidos inflamáveis e incêndios em equipamentos elétricos	Metais alcalinos
EXTINTOR DE PÓ QUÍMICO SÊCO	Líquidos e gases inflamáveis, metais alcalinos e incêndio em equipamento elétrico	Pode ser utilizado, mas só apaga fogo de superfície
EXTINTOR DE ESPUMA	Líquidos inflamáveis	Equipamentos elétricos
EXTINTOR DE BFC	Líquidos inflamáveis e incêndio em equipamento elétrico	Papel e madeira, pois só apaga fogo de superfície

OBS.: Após a utilização de extintores de BFC (BROMOCLOROFLUORMETANO), o ambiente deve ser bastante ventilado.



Capítulo 2

GERENCIAMIENTO DE AMOSTRAS

2.1- INTRODUÇÃO

O laboratório de referência estadual tanto pode receber como processar espécimes clínicos para realização da baciloscopia, cultura, identificação e teste de sensibilidade.

Para que o laboratório possa dar um resultado confiável, não basta que execute as técnicas de forma correta; é necessário que receba uma amostra adequada. Entende-se como boa amostra clínica a que provém do local da lesão, obtida em quantidade suficiente em um recipiente adequado, bem identificada, conservada e transportada corretamente.

No caso de receber culturas, estas devem estar íntegras, sem contaminação, com crescimento abundante de colônias que propiciem o repique. Culturas acidificadas ou alcalinizadas, apresentando rachaduras, ou em cultura mista, com crescimento disgônico ou insuficiente de colônias, podem não ser adequadas a realização de testes posteriores. Neste capítulo vamos abordar o gerenciamento de amostras no laboratório desde a colheita até o armazenamento. Estas amostras podem ser culturas semeadas ou espécimes clínicos.

2.2- COLHEITA DE ESCARRO

2.2.1- ESCARRO DE EXPECTORAÇÃO

2.2.1.1- Qualidade e Quantidade da Amostra

Uma boa amostra de escarro é a que provém da árvore brônquica, obtida após esforço de tosse, e não a que se obtém da faringe ou por aspiração de secreções nasais, nem tampouco a que contém somente saliva. O volume de 5 a 10ml é o ideal. Esse é o material mais adequado para ser processado quando o paciente vem para o diagnóstico. No caso de pacientes que estejam sob tratamento e que não tenham escarro purulento, mas com aspecto e consistência de saliva, deve-se processar a baciloscopia, assim mesmo, para que estes recebam alta por cura comprovada.

2.2.1.2- Recipiente

O material deve ser colhido em potes plásticos, de preferência com as seguintes características: descartáveis, com boca larga (50 mm de diâmetro), transparente, com tampa de rosca, altura de 40 mm, capacidade entre 35 a 50ml. O pote deve ser identificado com fita gomada ou com caneta para retroprojeter, onde serão inscritos o nome do paciente e a data da colheita. A identificação deve ser no corpo do pote e nunca na tampa.

2.2.1.3- Local da Colheita

As amostras devem ser colhidas em local aberto, de preferência ao ar livre ou em sala bem arejada, e pelo próprio paciente.

2.2.1.4- Momento da Colheita e Número de Amostras

O diagnóstico deve ser feito a partir de pelo menos duas amostras de escarro, sendo a primeira geralmente colhida no momento da consulta, para aproveitar a presença do doente.

A segunda amostra deve ser colhida no dia seguinte ao despertar, e é geralmente abundante porque provém das secreções acumuladas na árvore brônquica durante a noite. Se uma terceira amostra é solicitada, aproveita-se o momento de entrega da segunda amostra.

2.2.1.5- Orientação ao Paciente

Cabe ao pessoal da Unidade de Saúde orientar o paciente de modo claro e simples quanto à colheita do escarro, procedendo da seguinte maneira:

- antes de entregar o recipiente ao paciente, deve-se verificar se o frasco fecha bem e se o mesmo já está devidamente identificado, com o nome do paciente e a data da colheita no corpo do pote;
- ao despertar pela manhã o paciente deve lavar bem a boca, inspirar profundamente, deter por um instante o ar nos pulmões e lançá-lo fora pelo esforço da tosse. Deve repetir essa operação até obter três eliminações de escarro, evitando que esse escorra pela parede externa do pote;
- o paciente deve, então, tampar o pote firmemente, e em seguida colocá-lo em um saco plástico com a tampa para cima. Tendo cuidado para que permaneça nessa posição. No final, o paciente deve lavar as mãos.

NOTA: Se não se consegue escarro através da expectoração, outros métodos podem ser utilizados para a obtenção das secreções pulmonares. Como esses espécimes são paucibacilares deverão ser processados para o cultivo. Recomenda-se indicar no pote o modo de obtenção dos mesmos para não serem confundidos com saliva. A colheita desses materiais é feita por profissional de saúde especializado.

2.2.1.6- Lavado Gástrico

A obtenção desse espécime requer hospitalização, pois é colhido logo que o paciente acorda, antes mesmo de se levantar e comer. Adicionar carbonato de sódio 1mg/1ml de lavado para neutralizar o suco gástrico. Este método é indicado para crianças, pois essas deglutem o escarro. Deve-se colher pelo menos duas amostras em dias consecutivos, em recipiente limpo.

2.2.1.7- Lavados Brônquicos (tráqueo-brônquico, broncoalveolar)

São colhidos por pessoal médico, e como esses procedimentos induzem a expectoração por vários dias recomenda-se a colheita sucessiva desses materiais. O lavado broncoalveolar pode ser processado para cultura sem descontaminação prévia, pois é material colhido assepticamente de sítio estéril.

2.2.1.8- Expectoração Induzida

Obtida pela inalação de solução salina hipertônica, aerossolizada, que irrita os pulmões e induz a tosse.

2.3- COLHEITA DE OUTROS MATERIAIS

2.3.1- URINA

Deve-se colher toda a urina da primeira micção da manhã em frasco limpo, de boca larga (de 300 a 500ml), após higiene íntima com água. Utiliza-se um número mínimo de três e máximo de seis amostras colhidas em dias consecutivos.

2.3.2- LÍQUIDOS ASSÉPTICOS

(Líquor, Líquidos Pleural, Ascítico, Sinovial, Pericárdico, Peritoneal)

Esses materiais são colhidos assepticamente por pessoal médico, no maior volume possível, e colocados em frascos estéreis. Recomenda-se a semeadura direta do material em meio de cultura no momento da colheita para se obter maior positividade.

2.3.3- MATERIAL DE RESSECÇÃO, BIÓPSIA

Esses materiais são colhidos assepticamente por pessoal médico, em frasco com água destilada ou salina fisiológica estéril. Não utilizar formol. Em caso de pleuris o fragmento de pleura deve ser colhido sempre que possível, pois apresenta positividade em cultura notoriamente superior ao líquido pleural.

2.3.4- PUS

Esse material, quando proveniente de cavidade fechada, é colhido através de punção, por pessoal médico, e é semeado diretamente em meio de cultura, no laboratório. Quando o material é de cavidade aberta geralmente é colhido através de swab.

Todo espécime colhido com swab deve ser imerso em água destilada ou salina fisiológica, num tubo estéril. Antes de a amostra ser processada, esgotar o conteúdo do swab, atritando-o contra a parede do tubo. O material diluído no líquido do tubo deverá ser semeado após tratamento.

2.3.5- SANGUE

A pesquisa de micobactérias no sangue está particularmente indicada nos casos de bacteremia, e, depois da medula óssea, é o material mais indicado para o diagnóstico em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. Esse material deve ser colhido assepticamente com anticoagulante (heparina e não EDTA) em volume de até 5ml. O sangue menstrual não é mais usado para o diagnóstico de tuberculose uterina, sendo indicada a biópsia de endométrio.

2.3.6- FEZES

Não são mais utilizadas para o diagnóstico de tuberculose intestinal. Neste caso, está indicado a biópsia. Alguns estudos relatam o isolamento de outras micobactérias de fezes de pacientes com AIDS.

2.4- CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE

Os espécimes clínicos devem ser, preferencialmente, enviados e processados no laboratório imediatamente após a colheita. Para o transporte de amostras devem-se considerar três condições importantes: MANTER SOB REFRIGERAÇÃO; PROTEGER DA LUZ SOLAR; E ACONDICIONAR DE FORMA ADEQUADA PARA QUE NÃO HAJA RISCO DE DERRAMAMENTO.

NOTA: Para transportar potes de escarro de uma unidade sanitária da periferia, para outra de maior complexidade, para a realização da baciloscopia, recomenda-se a utilização de caixas de isopor (por serem leves, protegerem do calor e da luz solar) acondicionadas com gelo reciclável ou cubos de gelo dentro de um saco plástico. Nunca coloque a requisição de exame juntamente com o pote, dentro do isopor.

2.5- RECEPÇÃO DE AMOSTRAS

2.5.1- MATERIAL CLÍNICO

Antes de iniciar o registro do material clínico recebido fazer a desinfecção da parte externa do recipiente, utilizando gaze ou algodão embebido em hipoclorito de sódio a 2%. É obrigatório que o técnico proteja suas mãos de um possível contato com agentes infecciosos através do uso de luvas, além de usar respirador e avental. Comprovar se a amostra está corretamente identificada, de acordo com a requisição enviada, e se a quantidade e a qualidade do material estão adequados. Se for insuficiente ou inadequada, solicitar de imediato novo material.

Registrar os dados completos do paciente e os de solicitação de exames e fornecer o número ao portador. Rotular o recipiente. Armazenar em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

2.5.2- CULTURAS

As caixas contendo culturas devem ser abertas dentro de uma Cabine de Segurança Biológica por um técnico, vestindo luvas, avental e respirador. Há que se ter cuidado especial para não se cortar com tubos quebrados. Se a aparência externa da embalagem denotar que o envio está fora dos padrões de segurança ou que foi enviado pelo correio, o cuidado deve ser maior. Essas culturas devem ser registradas e armazenadas em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, principalmente para evitar a contaminação por formigas, fungos etc. A tampa deve ser lacrada com fita adesiva para evitar ressecamento e contaminação. As culturas positivas produzidas pelo laboratório podem ser armazenadas da mesma maneira, para manipulação posterior.

2.6- CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO E REJEIÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras (espécimes clínicos e culturas) serão aceitas se fizerem parte de projetos, acordos e convênios estabelecidos pelo Laboratório Central. Os dados pessoais, clínicos e epidemiológicos do paciente e a justificativa para a solicitação do exame devem ser informados. A requisição deve estar assinada e carimbada de modo legível. Tanto o material clínico quanto a cultura devem estar adequadamente rotulados, embalados e transportados. Se a embalagem ou recipiente com o material não estiverem íntegros o material será rejeitado. Se as culturas apresentarem alteração de pH, crescimento de contaminantes, crescimento disgônico de colônias, serão rejeitadas. Qualquer irregularidade será informada a quem enviou o material. Todo o material rejeitado será esterilizado em autoclave a 121°C e descartado no lixo.

2.7- ARMAZENAMENTO

O material ficará armazenado no laboratório o tempo necessário previsto na legislação própria. Os materiais analisados podem ser utilizadas como amostras para compor painel para validação de testes diagnósticos ou outros projetos, caso tenha sido acordado previamente por ambas as partes.

No capítulo 9 “CONTROLE DE Qualidade NO LABORATÓRIO DE MICOBACTERIOLOGIA” encontra-se descrito o procedimento para armazenamento das amostras em freezer a -70°C .

2.8- ENVIO DE MATERIAIS

Deverão ser observadas as regras internacionais da IATA (International Air Transport Association) para o envio aéreo. O material deve ser colocado em um frasco bem vedado, à prova de vazamento (recipiente primário) que é o próprio tubo de rosca no caso da cultura, ou um recipiente com material clínico, que será colocado em um segundo recipiente (secundário) à prova de vazamentos e inquebrável (metal, plástico). Entre esses dois colocar material absorvente (papel). O terceiro recipiente pode ser de papelão, madeira, isopor e deverá conter rótulo de material infeccioso (ver anexo) com instruções de seu manuseio (frágil), a posição para o transporte da embalagem e o telefone da autoridade sanitária a ser contactada em caso de acidente (vazamento, quebra da embalagem etc) e/ou o laboratório que está enviando a amostra. Essas embalagens devem ser compradas prontas e ter o registro no INMETRO. Culturas de micobactérias podem ser transportadas em meio sólido em tubos de rosca ou então liofilizadas.

2.9- AMOSTRAS-TIPO

O laboratório que identifica micobactérias necessita ter uma coleção de amostras-tipo indispensáveis para serem utilizadas como controles nos testes bioquímicos. Essas culturas são mantidas em freezer a -70°C em suspensões e precisam ser repicadas a cada 2 anos. Ao comprar estas culturas, ou mesmo quando fornecidas pelo laboratório de referência nacional, precisam estar acompanhadas do certificado de análise da coleção que a mantém e de onde foi originalmente adquirida. Ver nas tabelas abaixo as amostras que o LACEN necessita manter (Tab. 1) e as amostras que o laboratório de referência mantém e fornece para os laboratórios que necessitam de amostras-padrão para suas experiências (Tab. 2).

Tabela 1- Amostras-tipo que devem fazer parte da micobacterioteca do LACEN

ESTIRPES	DESIGNAÇÃO OFICIAL
<i>M.tuberculosis</i>	ATCC 27294 ($H_{37}R_v$)
<i>M.tuberculosis</i>	ATCC 25177 ($H_{37}R_A$)
<i>M.bovis</i> (BCG)	cepa Moreau
<i>M.bovis</i>	ATCC 19210
<i>M.kansasii</i>	ATCC 12478
<i>M.gordonæ</i>	ATCC 14.470
<i>M.intracellulare</i>	ATCC 13.950
<i>M.avium</i>	ATCC 25.291
<i>M.terræ</i>	ATCC 15.755
<i>M.fortuitum</i>	ATCC 6841
<i>M.peregrinum</i>	ATCC 14.467
<i>M.chelonæ</i>	NCTC 946
<i>M.abscessus</i>	ATCC 19.977

Tabela 2- Amostras-padrão que fazem parte da micobacterioteca do laboratório de referência nacional

<i>M. tuberculosis</i>	CC.01.00	ATCC 27294 (H ₃₇ R _V)
<i>M. tuberculosis</i>	CC.02.00	ATCC 25177 (H ₃₇ R _A)
<i>M. bovis</i>	CC.03.00	ATCC 19210
<i>M. kansasii</i>	CC.08.00	ATCC 12478
<i>M. marinum</i>	CC.09.00	ATCC 927
<i>M. gordonæ</i>	CC.10.00	ATCC 14.470
<i>M. scrofulaceum</i>	CC.11.00	ATCC 19.981
<i>M. flavescens</i>	CC.12.00	ATCC 14.474
<i>M. szulgai</i>	CC.13.00	NCTC 10.831
<i>M.intracellulare</i>	CC.14.00	ATCC 13.950
<i>M. avium</i>	CC.15.00	ATCC 25.291
<i>M. terræ</i>	CC.16.00	ATCC 15.755
<i>M. triviale</i>	CC.17.00	ATCC 23.292
<i>M. gastri</i>	CC.18.00	ATCC 15.754
<i>M.xenopi</i>	CC.19.00	NCTC 10.042
<i>M.fortuitum</i>	CC.20.00	ATCC 6841
<i>M.peregrinum</i>	CC.21.00	ATCC 14.467
<i>M.chelonæ</i>	CC.22.00	NCTC 946
<i>M.simiaë</i>	CC.24.00	ATCC 25.275
<i>M.nonchromogenicum</i>	CC.26.00	ATCC 19.530
<i>M.asiaticum</i>	CC.27.00	ATCC 25.276
<i>M.ulcerans</i>	CC.28.00	ATCC 19.423
<i>M.chitæ</i>	CC.30.00	ATCC 19.627
<i>M.diemhoferi</i>	CC. 31.00	ATCC 19.340
<i>M.duvallii</i>	CC.32.00	NCTC 358
<i>M.gilvum</i>	CC.33.00	NCTC 10.742
<i>M.vaccæ</i>	CC.34.00	ATCC 15.483
<i>M.aurum</i>	CC.35.00	ATCC 23.366
<i>M.obuense</i>	CC.37.00	ATCC 27.023
<i>M.rhodesiæ</i>	CC.38.00	ATCC 27.024
<i>M.neoaurum</i>	CC.39.00	ATCC 25.795
<i>M.chubuense</i>	CC.40.00	ATCC 27.278
<i>M.aichiense</i>	CC.41.00	ATCC 27.280
<i>M.gadium</i>	CC.42.00	ATCC 27.726
<i>M.phlei</i>	CC.43.00	ATCC 11.758
<i>M.thermoresistibile</i>	CC.44.00	ATCC 19.527
<i>M.agri</i>	CC.45.00	ATCC 27.406
<i>M.smegmatis</i>	CC.46.00	ATCC 19.420
<i>M.senegalense</i>	CC.47.00	NCTC 10.956
<i>M.fallax</i>	CC.48.00	ATCC 35.219
<i>M.komossense</i>	CC.49.00	ATCC 33.013
<i>M.porcinum</i>	CC.50.00	ATCC 33.776
<i>M.farcinogenes</i>	CC.51.00	NCTC 10.955
<i>M.lentiflavum</i>	CC.54.00	ATCC 51.985
<i>M.mageritense</i>	CC.55.00	ATCC 700.351
<i>M.mucogenicum</i>	CC.56.00	ATCC 49.650
<i>M.abscessus</i>	CC.58.00	ATCC 19.977

2.10- BIBLIOGRAFIA

- 1- BRASIL/MS/ FUNASA/CENEPI/CRPHF - *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro; 1994. 2ª ed. revisada e ampliada.
- 2- DAVID, HL; LÉVY-FRÉBAULT, V & Thorel, MF. *Méthods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Paris: Institute Pasteur; 1989.
- 3- KENT, PT & KUBICA, GP. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
- 4- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD/Organizacion Mundial de la Salud/Centro Panamericano de Zoonosis. “La muestra. El Examen Microscopico” (Parte I). IN: *Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriologia de la Tuberculosis*. Nota Tecnica n° 26/ Rev.1, Martinez: CEPANZO;1988.



Capítulo 3

BACILOSCOPIA

3.1- IMPORTÂNCIA

A baciloscopia é o exame básico para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, especialmente na forma pulmonar. Por ser de execução rápida, fácil e de baixo custo, favorece uma ampla cobertura diagnóstica, identificando a principal fonte de infecção (doentes bacilíferos) permitindo a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão.

É utilizada para acompanhar a eficácia do tratamento através da redução bacilar e negatificação do escarro em exames mensais, enquanto o paciente tiver expectoração.

Para obter um resultado positivo na baciloscopia, é necessário pelo menos 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro, em contraste com a cultura que é uma metodologia mais sensível e que pode detectar a partir de 10 a 100 células viáveis por amostra. No entanto, o exame microscópico do escarro é considerado a mais importante atividade do programa de controle da tuberculose, na busca e detecção dos casos bacilíferos.

3.2- PREPARAÇÃO

Por ser o material clínico mais utilizado no diagnóstico da tuberculose pulmonar, descreveremos a seguir a preparação do esfregaço para o exame microscópico do escarro:

- após a preparação do local de trabalho identificar os potes de escarro no corpo dos mesmos. A numeração da lâmina pode ser feita com fita crepe;
- colocar as amostras em ordem crescente e as respectivas lâminas em frente de cada pote. Essas devem ser novas e desengorduradas por imersão em solução de álcool. Numerá-las do lado oposto ao do esfregaço. Fazer uma linha divisória que corresponda a 1/3 da lâmina, sendo o restante destinado ao esfregaço. Deve-se ter o cuidado para não tocar os dedos na parte destinada ao esfregaço;
- abrir somente o pote da amostra que se vai fazer o esfregaço;
- com o aplicador de madeira partido em dois e utilizando o lado das pontas farpadas, escolher a partícula mais densa ou mais purulenta do escarro ou uma mistura da amostra, quando só existirem pequenas partículas purulentas ou mucosas;
- colocada a partícula próxima à linha divisória, estender com o mesmo aplicador até o extremo oposto. Evitar os espaços vazios. Desprezar o excesso no próprio frasco da amostra. Não se deve aquecer a lâmina enquanto o esfregaço estiver sendo preparado, pois ocorre a formação de círculos e precipitados granulados com o calor, prejudicando com isso os resultados da leitura, além do que projeta aerossóis;
- ao término do esfregaço, desprezar o aplicador de madeira no recipiente para autoclavagem ou incineração e colocar o pote bem fechado na geladeira para ser guardado até a saída dos resultados;
- evitar confeccionar esfregaço com alça metálica, pois há grande formação de aerossóis durante a flambagem no bico de Bunsen;
- colocar as lâminas sobre estante para secagem natural (sem aquecimento);
- após a secagem fixar três vezes no fogo rapidamente, mantendo o esfregaço na parte superior da lâmina;
- nunca deixe as lâminas sem fixar, após a realização do esfregaço, mesmo que se vá corá-las no dia seguinte, por exemplo. Desta forma não se perde o material da lâmina;
- as lâminas fixadas podem conter bacilos viáveis. O ideal é que se core logo depois de confeccionado o esfregaço. Se for armazenar embrulhe a lâmina num papel alumínio e coloque na geladeira.

3.3- RECOMENDAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

Este teste deverá ser executado segundo a técnica asséptica, em cabine de segurança biológica classe II B2 ou B3. O técnico deverá estar utilizando equipamentos de proteção individual como luva, respirador N 95, avental descartável para realizar o esfregaço e a coloração. A manipulação de corantes, fenol, xilol necessitam de EPIs próprios, pois apresentam risco ao serem manipulados. Ver capítulo “BIOSSEGURANÇA”.

3.4- PROCEDIMENTOS

3.4.1- MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN (6)

3.4.1.1- Princípio

Este método está baseado na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após coloração e não se deixar descorar pela ação do álcool-ácido e é amplamente utilizado em todo o mundo.

3.4.1.2- Soluções

3.4.1.2.1- Fucsina Fenicada a 0,3%

Fucsina básica3g
 Álcool etílico a 95% PA100ml

Dissolver por agitação a fucsina no álcool e juntar 55ml de fenol líquido e água destilada quente até completar 1.000ml. Deixar repousar por 24 horas.

Filtrar com o auxílio de papel de filtro e estocar em frasco escuro identificado.

3.4.1.2.2- Fenol Aquoso

Pesar 1.000g de fenol cristalizado e dissolvê-lo em 100ml de água destilada. Aquecer em banho-maria e deixar esfriar. Anotar a preparação na ficha 1 “Controle da Preparação do fenol líquido para o método de coloração de Ziehl-Neelsen”.

3.4.1.2.3- Azul de Metileno a 0,1%

Pesar em balança de precisão 1g de azul de metileno, dissolver por agitação com 100ml de álcool etílico PA e juntar água destilada até completar um litro.

Deixar repousar por 24 horas, filtrar e estocar em frasco escuro.

3.4.1.2.4- Solução Descorante

Colocar em um frasco 970ml de álcool etílico, e em seguida com uma pipeta deixar escorrer pela parede do frasco 30ml de ácido clorídrico PA. Agitar suavemente. Anotar esses procedimentos na ficha 2 “Controle da Preparação dos Reagentes Para o Método de Coloração de Ziehl-Neelsen”.

IMPORTANTE: Cada vez que as soluções corantes forem transferidas para os frascos conta-gotas, devem ser filtradas. Este procedimento é particularmente necessário para a fucsina fenicada, porque com o tempo formam-se pequenos cristais que se depositam nas lâminas formando artefatos, causando erro nas leituras. Os frascos conta-gotas e suas tampas devem ser lavados cada vez que se reponha seu conteúdo.

3.5- TÉCNICA

- colocar as lâminas fixadas, conservando a ordem numérica, sobre o suporte para coloração. Esse suporte pode ser feito com varas de vidro ou alumínio, que são colocadas sobre a pia. As lâminas devem ficar com o esfregaço para cima, separadas uma da outra e com o número voltado para o operador. É conveniente que a vara mais próxima do operador esteja ligeiramente mais alta que a outra. Essa pequena diferença de nível permite que os reativos não deslizem para a parte da lâmina destinada ao número, evitando que este se apague. Além disso, permite tomar a lâmina entre o polegar e o indicador, quando não se dispõe de pinça;
- cobrir a totalidade da superfície do esfregaço com solução de fucsina fenicada previamente filtrada. os corantes também podem ser filtrados sobre as lâminas no momento da coloração;
- aquecer suavemente com a chama de algodão umedecido em álcool ou com a chama do bico de Bunsen elétrico, passando lentamente por baixo das lâminas, até que se produza emissão de vapores e, quando estes são visíveis, cessar o aquecimento. Repetir essa operação até completar três emissões sucessivas. No total essa operação não deve durar mais de cinco minutos a contar da primeira emissão de vapores. A fucsina não deve ferver, e, se diminuir por evaporação ou derrame, deve ser repostada, porque o esfregaço precisa estar coberto permanentemente durante o aquecimento. Eliminar a fucsina tomando a lâmina pelo extremo numerado, inclinar para frente e lavar deixando cair um jato de água de baixa pressão sobre a película corada, de maneira que essa não se desprenda;
- cobrir toda a superfície do esfregaço com a solução de álcool-ácido. Tomar a lâmina entre o polegar e o indicador e fazer um movimento de vai e vem, de modo que o álcool-ácido vá descorando suavemente a fucsina. Se o esfregaço estiver ainda com cor vermelha ou rosada, descobre-o novamente. Considera-se descorado o esfregaço quando suas partes mais grossas conservarem somente um ligeiro tom rosado. Essa operação dura, em geral, dois minutos. Uma vez eliminado o álcool-ácido, lavar as lâminas da mesma forma como se procedeu depois da coloração com a fucsina, com cuidado para não desprender a película;
- cobrir toda a superfície do esfregaço com solução de azul de metileno durante trinta segundos. Lavar, da mesma forma como se indicou para a fucsina, tanto o esfregaço como a parte inferior da lâmina. Colocar as lâminas com o esfregaço para cima, sobre o papel limpo, para secar a temperatura ambiente, conservando sempre a ordem estabelecida;

Uma vez secos os esfregaços corados rever a numeração das lâminas.

3.6- LEITURA E INFORME DE RESULTADOS

Com a técnica de Ziehl-Neelsen, as micobactérias apresentam-se como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos, corados em vermelho com fundo azul (ver anexo) e, portanto referidos como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A leitura deve ser feita no mínimo em cem campos microscópicos, o que corresponde, aproximadamente, à leitura de uma

linha reta que vai do extremo onde está a numeração até o extremo oposto, isso correspondendo a mais ou menos 5 minutos de observação. Recomenda-se um intervalo de 10 minutos de descanso para cada dez lâminas lidas. Após a leitura, as lâminas que não forem enviadas para o controle de qualidade devem ser desprezadas num cemitério ou num frasco contendo hipoclorito de sódio a 1%. Recomenda-se utilizar um desenho quadriculado para ir anotando o número de bacilos encontrados em cada campo microscópico e o resultado deve ser informado em número de cruzes segundo a escala apresentada abaixo:

Escala semiquantitativa:

- (-) Não foram encontrados BAAR em 100 campos observados
- (1-9)Nº de bacilos em 100 campos observados
- (+) Presença de menos de 1 BAAR por campo em 100 campos observados
- (++) Presença de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados
- (+++) Presença de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados

3.7- MATERIAL UTILIZADO

- ácido clorídrico concentrado PA;
- ácido sulfúrico;
- álcool etílico 95% PA;
- álcool etílico comercial 95°GL/92,5 INPM;
- algodão hidrófobo;
- aplicador de madeira;
- avental de policarbonato;
- azul de metileno;
- balança analítica;
- balança de prato superior;
- balão de fundo chato, de 250 a 2.000ml;
- balão volumétrico de 10, 100, 500 e 1000ml;
- becher de 50 a 1.000ml;
- bico de Bunsen;
- cabine de exaustão de gases;
- cabine de segurança biológica classe II B2/B3;
- caixa de madeira para guardar lâminas;
- despertador de bancada;
- dessecador;
- destilador, deionizador;
- erlenmeyer de 250 a 2.000ml;

- espátula para pesagem de pós;
- fenol em cristais;
- fita adesiva para controle de autoclavação;
- frasco conta-gotas para corantes de 250ml;
- frasco escuro para estocar reagentes de 100 a 1.000ml;
- fucsina básica;
- funil de 100 a 500ml;
- gaze 8 fios tipo queijo;
- geladeira;
- graal de porcelana com pistilo;
- hipoclorito de sódio a 5%;
- lâmina de vidro para microscopia;
- luva de borracha natural;
- luva de vinil;
- microscópio binocular;
- óculos;
- óleo de cedro;
- pinça anatômica;
- pipeta sorológica graduada ao décimo e ao centésimo de 1,2,5,10ml;
- potes plásticos para colheita de escarro;
- proveta graduada de 100 a 2.000ml;
- recipientes de aço inoxidável com tampa para descarte, transporte e armazenamento temporário de material contaminado;
- respirador N95 ou N99;
- sacos plásticos para autoclavação;
- suporte de aço para colocar lâminas;
- xilol.

3.8- CONTROLE DE QUALIDADE

Ao término da leitura deve-se retirar o óleo de cedro com xilol, vertendo o frasco conta-gotas de maneira delicada e fazendo movimento de vai e vem para que o óleo seja retirado, mas tendo o cuidado de deixar o esfregaço intacto. Deixar secar ao ar e acondicionar as lâminas em caixas de madeira apropriadas para tal ou então embrulhá-las individualmente em papel alumínio ou papel toalha. Guardar em geladeira, protegendo sempre o esfregaço contra a abrasão, a luz, o calor e contra os insetos.

Todas as lâminas realizadas pela unidade de saúde, tanto as positivas quanto as negativas, deverão ser guardadas para serem sorteadas e enviadas ao laboratório de referência (regional ou estadual) para controle de qualidade.

A cada coloração e leitura, uma lâmina positiva e outra negativa deverão ser colocadas para sofrer todo o processo de coloração e leitura do esfregaço, para controle de qualidade.

NOTA: Todos os laboratórios públicos e privados que fazem a Baciloscopia da Tuberculose devem utilizar o “Livro de Registro de Baciloscopia da Tuberculose” e o aplicativo SILTB para registrar os exames dos pacientes.

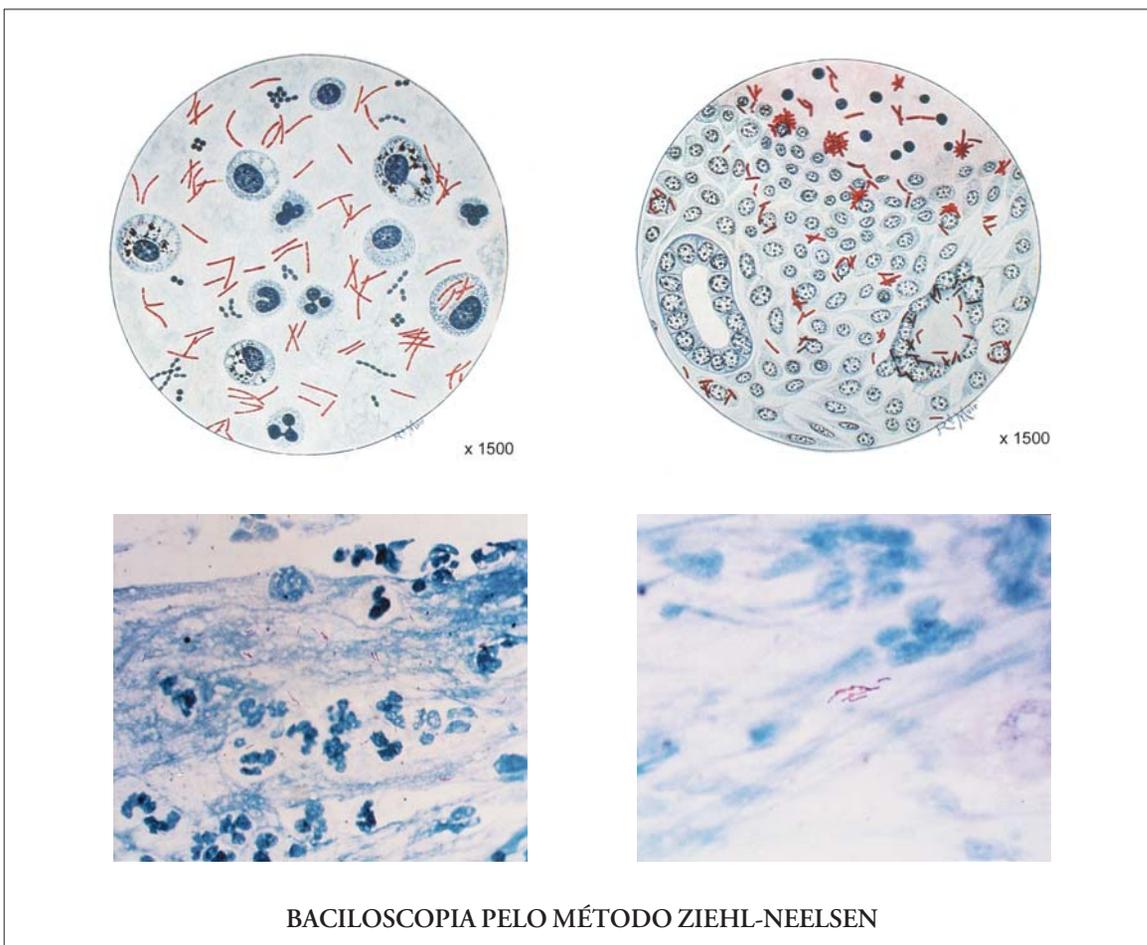
Ao final da baciloscopia, os resultados deverão ser transcritos para o Livro de Registro e digitados no aplicativo SILTB.

3.8.1- FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR O RESULTADO GERAL DO EXAME

- amostra insuficiente em quantidade ou qualidade;
- identificação descuidada no pote. Não se deve identificar a tampa e sim o corpo do pote;
- área de trabalho inadequada ou mal iluminada;
- troca das lâminas por falta de disciplina no trabalho;
- processamento de uma série muito grande de amostras simultaneamente. Recomenda-se no máximo uma série de doze;
- esquecer de misturar os escarros se as eliminações são poucas e se estão separadas dentro do pote;
- esfregaços muitos espessos ou muito delgados;
- uso de lâminas arranhadas ou que tenham sido utilizadas anteriormente, que podem simular bacilos pela deposição de corantes nas ranhuras;
- fucsina seca e cristalizada no fundo do frasco. Deve-se usar fucsina recentemente filtrada e colocada em frasco bem lavado;
- descuido no aquecimento da fucsina, permitindo que seque e cristalize no esfregaço;
- o descoramento insuficiente das lâminas pode deixar corado em vermelho outros bacilos, que assim se confundem com o bacilo da tuberculose;
- tempo de descoramento muito prolongado pode levar ao descoramento do bacilo da Tuberculose.
- não revisar a numeração das lâminas ou não renumerá-las caso os números se apaguem durante a coloração;
- não limpar a lente de imersão depois de cada exame positivo;
- existência de bacilos no óleo de imersão devido ao mau costume de tocar o esfregaço com o conta-gotas do frasco;
- anotação errada do resultado na folha de trabalho diário;
- confundir os resultados ao transcrever da folha de trabalho diário para o impresso a ser fornecido ao setor.

3.9- ILUSTRAÇÕES





3.10- BIBLIOGRAFIA

- 1- BRASIL/MS/ FUNASA/CENEPI/CRPHF. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 1994. 2ª ed. revisada e ampliada.
- 2- CARDOSO, CL; GIACOMELLI, LRB; HELBEL, C [ET ALII]. *Survival of tubercle bacilli in heat-fixed and stained smears*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2001; 96 (2): 277-280.
- 3- DAVID, HL; LÉVY-FRÉBAULT, V. & Thorel, MF. *Méthods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Paris: Institute Pasteur; 1989.
- 4- KENT, PT. & KUBICA, GP. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
- 5- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD/Organizacion Mundial de la Salud/Centro Panamericano de Zoonosis. "La muestra. El Examen Microscopico" (Parte I). IN: *Manual de Normas y Procedimientos Tecnicos para la Bacteriologia de la Tuberculosis*. Nota Tecnica nº 26/ Rev.1, Martinez: CEPANZO;1988.
- 6- UNION INTERNACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS. *Guía técnico para recolección, conservación y transporte de las muestras de esputo y examen por microscopia directa para la tuberculosis*. Bol. Un. Int. Tuberc, 1978.

FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO FENOL LÍQUIDO
PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Fenol Cristalizado			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

--	--

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Fenol Cristalizado	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--

RESPONSÁVEL

--

FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE	
Fucsina Básica				
Álcool etílico 95% PA				
Fenol Cristalizado				
Azul de Metileno				
Hcl				
PESAGEM / VOLUME				
SUBSTÂNCIA	CORANTES	ÁLCOOL ETÍLICO	FENOL LÍQUIDO	H ₂ O DESTILADA
Fucsina Básica				
Azul de Metileno				
Hcl				
CONTROLE DE QUALIDADE				
APROVADO () REPROVADO ()				
OBSERVAÇÕES				
RESPONSÁVEL				



Capítulo 4

CULTURA

4.1- INDICAÇÃO

A cultura é o método bacteriológico mais acurado disponível até o momento para o diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Enquanto o diagnóstico da forma pulmonar pela baciloscopia requer 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro, o diagnóstico através da cultura pode ser realizado a partir de 10 bacilos por mililitro de escarro. A cultura possibilita dessa forma, diagnosticar mais precocemente os casos novos de tuberculose pulmonar, nos quais a eliminação bacilar não é suficiente para ser detectada pela baciloscopia, evitando o aparecimento dos bacilíferos que são a fonte de transmissão da doença. Além de que, o cultivo permite posterior identificação da micobactéria isolada, assim como a realização do teste de sensibilidade, o que não é possível quando se realiza somente a baciloscopia.

Além da cultura estar indicada para o diagnóstico das formas paucibacilares da tuberculose pulmonar, deverá ser usada também rotineiramente em todas as formas extrapulmonares, para o diagnóstico das micobacterioses e nos serviços que recebam material para o diagnóstico de pacientes co-infectados com o vírus HIV.

4.2- PROCEDIMENTOS DE ISOLAMENTO

Os espécimes utilizados para o isolamento de micobactérias podem ser contaminados, isto é, aqueles que apresentam flora microbiana associada, como escarro, lavados, aspirados, urina, material de cavidade aberta e espécimes não contaminados, ou seja, aqueles provenientes de cavidades fechadas, como os líquidos orgânicos etc.

Espécimes contaminados devem ser tratados com a finalidade de eliminar os microrganismos contaminantes, que, por se desenvolverem muito mais rapidamente que as micobactérias, impedem a multiplicação dessas. Esse tratamento é feito com agentes químicos aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes, e, além disso, possibilita a digestão da matéria orgânica do material.

Nos espécimes não contaminados o tratamento não é necessário desde que os mesmos tenham sido colhidos assepticamente e colocados em frasco estéril. Para evitar a possibilidade de perda da cultura por contaminação é recomendável semear metade do material, após concentração por centrifugação. No caso de líquidos, guardar a outra parte na geladeira e observar os tubos semeados nas 48 horas seguintes. Se houver contaminação, tratar o material como em 4.3 e, se não houver, semear o restante. Para material de biópsia, deve-se macerar em graal com areia e juntar água destilada estéril. O isolamento de micobactérias a partir do sangue começou a ser realizado após o advento da AIDS, para o diagnóstico de formas disseminadas.

4.3- MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Os espécimes devem ser processados para a cultura preferencialmente em tubo de polipropileno, autoclavável com capacidade para 30ml, com tampa de rosca. No caso de urina, deve-se centrifugar todo o volume, em vários tubos. Juntar os sedimentos e submeter à descontaminação. Nesse processo, o tempo de contato do agente químico com o espécime, assim como a concentração do agente químico, a neutralização e a centrifugação (força centrífuga e tempo) são procedimentos críticos para o isolamento de micobactérias.

4.3.1- MÉTODO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO (9)

4.3.1.1- Indicação

Este método é recomendado para o tratamento de espécimes paucibacilares, por utilizar uma concentração mais baixa de hidróxido de sódio (1%) que a utilizada em outros métodos e, um agente tensoativo que facilita a homogeneização dos espécimes.

4.3.1.2- Soluções

4.3.1.2.1- Solução Descontaminante e Fluidificante (Solução “A”)

Pesar em balança de precisão 30g de lauril sulfato de sódio e 10g de hidróxido de sódio, dissolver em 1 litro de água destilada, previamente aquecida a 60°C. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Conservar essa solução à temperatura ambiente. Anotar na ficha 1 “Controle da Preparação dos Reagentes Para o Método do Lauril Sulfato de Sódio”.

4.3.1.2.2- Solução Neutralizante (Solução “B”)

Juntar 6,5 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) PA e 2,0ml de azul de bromotimol ou púrpura de bromocresol a 0,4% (solução “C”) a 1litro de água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

4.3.1.2.3- Solução de Azul de Bromotimol ou Púrpura de Bromocresol a 0,4% (Solução “C”)

Pesar em balança de precisão 0,4g de azul de bromotimol ou púrpura de bromocresol, e dissolver em 20ml de álcool etílico comercial. Aquecer e completar com água destilada até 100ml. Anotar na ficha 2 “Controle da Preparação do Indicador de pH Para o Método do Lauril Sulfato de Sódio” toda vez que preparar o corante.

4.3.1.3- Procedimento

Antes de tratar o material, calcular previamente o volume da solução B necessário para neutralizar a solução A. Assim que as soluções forem preparadas, autoclavadas e resfriadas, juntar 3ml de cada uma delas e medir o pH no potenciômetro. A partir daí fazer correções contínuas, aumentando o volume da solução B, até chegar ao pH 7,0, calculando-se quanto de B neutraliza 2ml, 3ml, 4ml e 5ml da solução A. Anotar na ficha 1 “Controle da Preparação dos Reagentes Para o Método do Lauril Sulfato de Sódio”.

Adicionar 3ml da Solução “A” a aproximadamente 2ml do espécime contido em tubo de centrífuga com capacidade para 30ml. No caso de escarro muito purulento deve-se aumentar o volume da Solução “A” (3,5 a 4,0ml), a fim de fluidificar o espécime. O volume de 2ml do espécime deverá ser obtido a partir da parte mais purulenta.

Agitar periodicamente por 30 minutos.

Juntar a Solução “B” em volume suficiente para neutralizar a solução “A”. Centrifugar a 3.000g durante 30 minutos.

Desprezar o sobrenadante, em recipiente à prova de respingos. Semear todo o sedimento em volumes de 0,1ml por tubo de meio de cultura.

Colocar os tubos em estantes, na posição horizontal, em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 45 dias.

4.3.2- MÉTODO DE CORPER & STONER, MODIFICADO (6)

4.3.2.1- Indicação

Este método é utilizado para tratamento de espécimes paucibacilares pois a atuação do fosfato trissódico sobre as micobactérias é menor, quando comparado com outros métodos.

4.3.2.2- Soluções

4.3.2.2.1- Solução de Fosfato Trissódico a 23% (Solução “A”)

Pesar em balança de precisão 23g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e dissolver em 100ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Anotar na ficha 3 “Controle do Reagente A Para o Método de Corper & Stoner”.

4.3.2.2.2- Solução de Fosfato Monossódico a 20% (Solução “B”)

Pesar em balança de precisão 20g de NaH_2PO_4 e dissolvê-lo em 100ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Anotar na ficha 4 “Controle do Reagente B Para o Método de Corper & Stoner”

4.3.2.2.3- Procedimento

Adicionar a Solução “A” em volume igual ao do espécime a ser tratado em tubo com capacidade para 30 ml. Agitar. Deixar na estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Neutralizar com a Solução “B” com volume igual ao utilizado na Solução “A”. Agitar. Centrifugar a $3000 \times g$ durante 30 minutos. Desprezar o sobrenadante em recipiente a prova de respingos. Ressuspender o sedimento com água destilada estéril.

Semear todo o sedimento em volumes de 0,1 ml por tubo com meio de cultura. Colocar os tubos em estantes, na posição horizontal, em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 45 dias.

4.4- MEIOS DE CULTURA

O meio mais utilizado para o isolamento de micobactérias é o de Lowenstein Jensen (LJ), que é um meio solidificado à base de ovo e contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Esse meio permite o crescimento da maioria das espécies micobacterianas de interesse médico. A utilização de piruvato de sódio como fonte de carbono ao invés de glicerol é recomendado para o isolamento de *M. bovis* e *M. africanum*. Outros meios solidificados à base de ágar como 7H10 e 7H11 de Middlebrook também podem ser utilizados para antibiogramas, estudos de morfologia colonial, além do cultivo primário.

O meio líquido 7H9 de Middlebrook é bastante utilizado para o isolamento de materiais paucibacilares inclusive sangue, quando adicionado de substâncias anticoagulantes. É o meio ideal para repiques, conservação de amostras no freezer, preparação de inóculos padronizados e é o principal meio de cultura dos métodos automatizados.

A composição de diversos meios de cultura utilizados para o isolamento e/ou crescimento de micobactérias está apresentada no quadro 1 anexo e a preparação segue as normas estabelecidas pelo fabricante. Todos eles são encontrados no comércio, sendo que a qualidade dos meios está diretamente relacionada com a tradição de qualidade dos fabricantes.

Os meios podem ser utilizados em sistemas bifásicos para aumentar a chance de isolamento de matérias paucibacilares. O meio de 7H9 geralmente funciona como a fase líquida conjugado com os solidificados inclusive o LJ.

4.4.1- MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN (LJ)

4.4.1.1- Preparação de 1 Fórmula (1.600ml de meio base)

Dissolver o meio desidratado em água destilada, num balão de 2.000ml, segundo recomendação do fabricante. Adicionar o glicerol. Esterilizar em autoclave a 121° C por 15 minutos. Esfriar o balão em água corrente, agitando-o para que a fécula de batata não fique agarrada no fundo do frasco, formando uma crosta branca e assim possa se distribuir homogeneamente no meio de cultura.

Limpar, cuidadosamente, 20 ovos de tamanho médio, com o auxílio de escova, água e sabão. Enxaguar bem em água corrente e submergir em uma solução de álcool etílico a 70% durante 30 minutos. Retirar e secar com um pano estéril.

Quebrar os ovos, um a um, separadamente, em um becher estéril, para observar a qualidade dos mesmos. Transferi-los para um copo estéril de liquidificador ou *mixer* (para uso em laboratório) ou para um balão de 1.000ml com pérolas de vidro. Homogeneizar.

Transferir o homogeneizado para uma proveta de 1.000ml, com o auxílio de um funil provido de gaze estéril.

Adicionar o homogeneizado ao meio base. Agitar o balão suavemente. Distribuir em volumes de 4 ml em tubos de ensaio com 20 x 150mm.

Coagular a 80-85°C por 45 minutos.

Incubar a 36°C ± 1°C por 24 horas para fazer a prova de esterilidade.

Estocar na geladeira. Anotar todo o processo na ficha 5 “Controle da Produção de Meio de Lowenstein Jensen” anexa.

4.4.2- MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM PIRUVATO (PI)

Dissolver o meio desidratado em água destilada, num balão de 2.000ml, segundo recomendação do fabricante. Adicionar o piruvato de sódio na concentração de 500 µg/ml no lugar do glicerol. Esterilizar em autoclave a 121° C por 15 minutos. Esfriar o balão em água corrente, agitando-o. Todo o restante da preparação segue como no item 4.4.1., descrito acima. Anotar a preparação na ficha 6 “Controle da Produção de Meio de Lowenstein Jensen com Piruvato” anexa.

4.4.3- MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM CITRATO FÉRRICO AMONICAL (CFA)

Este meio é utilizado para o isolamento de micobactérias que são exigentes de ferro/hemina como o caso de *M. haemophilum*. Esta espécie é isolada principalmente de lesão de pele, necessitando de temperatura de incubação de 30°C± 1°C para seu crescimento e no Brasil já foram relatados alguns casos isolados.

4.4.3.1- Preparação

Preparar a base segundo recomendação do item 4.4.1. Adicionar o CFA na concentração de 2,5 % (5 g para 200ml de meio total, adicionado de ovos). Distribuir em tubo de rosca 20 x 150 mm, em volume de 5 ml. Coagular a 80-85°C durante 45 minutos. Anotar na ficha 7 “Controle da Preparação do Meio Lowenstein Jensen com Citrato Férrico Amoniacal”.

4.4.4- MEIO LÍQUIDO 7H9 DE MIDDLEBROOK

O meio líquido 7H9 de Middlebrook é o mais utilizado para repiques de cultivos, estocagem em freezer, padronização de inóculo por turvação e semeadura de materiais liquefeitos como sangue, macerados de tecidos, fluidos orgânicos em geral etc, e é o meio de cultura utilizado nos sistemas automatizados disponíveis no mercado. Anotar as observações do preparo na ficha 8 “Controle de Produção de Meio de Cultura Middlebrook 7H9”

4.4.4.1- Preparação da Base

Seguir a recomendação do fabricante em relação à preparação da base. Adicionar asépticamente o enriquecimento após esterilização e resfriamento do meio, na proporção de 20 ml de aditivo para cada 180 ml do meio base.

4.4.4.2- Enriquecimento ADC

O enriquecimento ADC é parte integrante da preparação do meio 7H9 de Middlebrook. Os fabricantes do meio base fornecem o aditivo já pronto para uso, mas pelo armazenamento e transporte até o consumidor não ser adequado muitas vezes o crescimento das culturas neste meio deixa a desejar. Na nossa rotina trabalhamos igualmente com o aditivo pronto e com este preparado, dando bons resultados.

4.4.4.2.1- Preparação

Albumina bovina fração V	5,0g
Dextrose	2,0g
Catalase	0,003g
H ₂ O destilada qsp	100ml

- pesar os sais e dissolver em água destilada numa proveta graduada;
- esterilizar por filtração em membrana esterilizante;
- distribuir em volumes de 20ml, assepticamente, em frascos de tampa de rosca;
- fazer o teste de esterilidade;
- guardar na geladeira a 4° C por até 6 meses;
- este enriquecimento é utilizado na composição do meio 7H9 de Middlebrook;
- anotar a preparação na Ficha 9 “Controle de Preparação do Enriquecimento ADC”.

4.4.5- MEIO LÍQUIDO 7H9 DE MIDDLEBROOK COM SPS (2)

Este meio é adicionado do anticoagulante polianetol sulfonato de sódio na concentração de 0,025%, que rompe os leucócitos e favorece a liberação de bacilos para o meio de cultura. O sangue deve representar 1/10 ou 1/20 em relação ao meio de cultura.

4.4.5.1- Preparação

Seguir a recomendação do fabricante em relação à preparação da base. Adicionar 0,05g de SPS à base antes da autoclavagem, para o volume de 200ml de meio final. Após esterilização e resfriamento do meio, adicionar assepticamente o enriquecimento na proporção de 20ml de aditivo para cada 180 ml do meio base. Distribuir em volumes de 10ml em tubos ou erlenmeyer estéreis. Anotar as observações do preparo na ficha 9 “Controle de Produção de Meio de Cultura Middlebrook 7H9 com SPS”.

4.4.6- INCUBAÇÃO E LEITURA DE RESULTADOS

Após a semeadura em meio solidificado, inclinar os tubos, em uma bandeja, com as tampas afrouxadas para permitir a secagem do inóculo. A temperatura ótima de incubação varia de 35 a 37° C. Para espécimes obtidos de pele e de lesões superficiais e para crescimento de culturas de *M. fortuitum*, *M. chelonæ*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. hemophilum*, a temperatura de incubação deverá ser de 30°± 1°C. Os tubos devem ser examinados nas primeiras 48 horas para a verificação da secagem do inóculo e quanto à presença de contaminação, sendo que a cor esbranquiçada indica alcalinização e a cor verde intensa indica acidificação. Fazer inspeções diárias dos tubos durante 48 horas, sem removê-los da estufa, para a verificação de contaminações. Fazer leituras semanais até a 6ª semana e após 20 dias fazer a primeira leitura e retirar os tubos com crescimento eugônico de colônias. Anotar os resultados na ficha 10 “Anotação dos Resultados das Culturas” e reincubar os tubos sem crescimento.

Informar os resultados das culturas positivas, relatando aspecto (forma, cor) e quantidade de colônias crescidas, segundo a escala semiquantitativa abaixo:

- (+++) Colônias confluentes
- (++) Colônias separadas (mais de 100)
- (+) 20 a 100 colônias
- (0) Sem crescimento
- (C) Contaminado

As colônias de *M. tuberculosis* apresentam cor creme, são rugosas, desenvolvem na superfície do meio e não alteram a cor do LJ.

As leituras dos meios líquidos são baseadas na turvação que apresentam nos tubos (resultado positivo) e na evidência ou não da presença de grumos no fundo do tubo.

4.5- BIOSSEGURANÇA

Este teste deverá ser executado segundo a técnica asséptica, em área de biossegurança nível 3 em cabine de segurança biológica classe II B2 ou B3. O técnico deverá estar utilizando equipamentos de proteção individual como luva, respirador N 95/N99, avental descartável, pipetador automático.

Após a execução das semeaduras ou leitura das culturas, descartar todo o material em recipiente de aço com tampa, para ser esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após este processo o conteúdo líquido dos frascos de ensaio será descartado no esgoto da pia sob fluxo de água corrente e os restos de meio de cultura no lixo adequado, segundo plano do LACEN.

4.6- MATERIAL NECESSÁRIO

- autoclave;
- ácido fosfórico PA;
- agitador de tubos;
- álcool etílico a 70%;
- álcool etílico comercial 95% GL/92,5 INPM;
- avental;
- azul de bromotimol em pó;
- balança de precisão;
- balão com pérolas de vidro;
- balão;
- batedeira;
- becher;
- cabine de segurança biológica classe II B2 ou B3;
- caneta hidrográfica;
- carrinho de aço;
- centrífuga refrigerada;
- citrato férrico amoniacal;
- coagulador;
- contador de colônias;
- deionizador de água;
- despertador de bancada;
- erlenmeyer;
- espátula de pesagem;
- estantes de madeira;
- estufa bacteriológica;

- fosfato monossódico em pó;
- fosfato trissódico em pó;
- frasco de reagentes, com tampa de rosca, 2.000ml;
- funil de aço;
- gaze;
- geladeira;
- glicerol;
- hidróxido de sódio em lentilhas;
- lauryl sulfato de sódio em pó;
- luva de látex ou vinil;
- meio de Lowenstein Jensen em pó;
- meio 7H9 de Middlebrook em pó;
- ovos;
- pipetador automático;
- pipetas de borosilicato;
- piruvato de sódio PA;
- polianetol sulfonato de sódio;
- potenciômetro;
- proveta de 1000ml;
- púrpura de bromocresol em pó;
- recipiente a prova de respingo;
- recipiente de aço para descarte de material contaminado;
- respirador N95 ou N99;
- tubos de borosilicato, 20x150mm;
- tubos com meio de Lowenstein Jensen;
- tubos com meio 7H9 de Middlebrook;
- tubos de polipropileno de 30ml.

4.7- ILUSTRAÇÕES



4.8- BIBLIOGRAFIA

- 1- BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI/ CRPHF - *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 1994. 2ª ed revisada e ampliada.
- 2- DAVID, H; BRUM, P & PRIETO, E. *Manual de Microbacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos*. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.
- 3- DAVID, HL; LÉVY-FRÉBAULT, V & Thorel, MF. *Méthods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Paris: Institute Pasteur; 1989.
- 4- DIFCO. Manual DIFCO. Detroit. 10ª ed.
- 5- KENT, PT & KUBICA, GP. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
- 6- MAGARÃO, MF & LINHARES, H. *Diagnóstico bacteriológico da tuberculose*. Rio de Janeiro: Campanha Nacional Contra a Tuberculose, 1949.
- 7- NOLTE, FS & METCHOCK, B. "Mycobacterium". IN: MURRAY, PR; BARON, EJ [ET ALII]. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology; 1994. 6th ed; pp: 400-437.
- 8- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD/Organizacion Mundial de la Salud/Centro Panamericano de Zoonosis. "La muestra. El Examen Microscopico" (Parte I). IN: *Manual de Normas y Procedimientos Tecnicos para la Bacteriologia de la Tuberculosis*. Nota Tecnica nº 26/ Rev.1, Martinez: CEPANZO;1985.
- 9- SAMPAIO, JLM; ALVES, VAF; LEÃO, SC [ET ALII]. *Mycobacterium hemophilum: emerging or undiagnosed in Brazil?* Emerg Infect Dis, 2002; 8:1359.
- 10-TISON, F. & CARBONELLE, B. *Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courant*. Sille: Crouan et Roques (ed), 1972.

QUADRO 1- COMPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE MICOBACTÉRIAS

NUTRIENTE	MEIO DE CULTURA			
	LJ ^a g/ 600 ml	7H-9 4,7 g/l	7H-10 19 g/l	7H-11 21 g/l
Citrato férrico amoniacal	-	0,04	0,4	0,04
Fosfato dissódico	-	2,5	1,5	1,5
Fosfato monopotássico	2,4	1,0	1,5	1,5
Sulfato de magnésio	0,24	0,05	0,025	0,05
Citrato de magnésio	0,6	-	-	-
L-asparagina	3,6	-	-	-
Sulfato de amônio	-	0,5	0,5	0,5
L-glutamato	-	0,5	0,5	0,5
Casitoria	-	-	-	1
Piridoxina	-	0,01	0,001	0,001
Biotina	-	0,0005	0,0005	0,0005
Citrato de sódio	-	0,1	0,4	0,4
Cloreto de cálcio	-	0,0005	0,0005	-
Sulfato de zinco	-	0,001	0,001	-
Sulfato de cobre	-	0,001	0,001	-
Verde malaquita	0,4	-	0,00025	0,001
Agar	-	-	15,0	15,0
TWEEN 80	-	0,5	-	-
Fécula de batata	30,0	-	-	-
Glicerol (ml)	12,0	5,0	5,0	5,0

Aditivos / Suplementos

Ovos totais (ml)	1000,0	-	-	-
Ácido oléico (g)	-	-	0,05	0,05
Albumina bovina fração V (g)	-	5,0	5,0	5,0
Dextrose (g)	-	2,0	2,0	2,0
Catalase (g)	-	0,0003	0,04	0,04
Cloreto de sódio (g)	-	-	0,85	0,85
Água destilada (ml)	-	100	100	100

*Para preparar LJ com piruvato de sódio, basta adicionar o sal na concentração de 500ug/ml de meio base. Não adicionar glicerol.

FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
PARA O MÉTODO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Laurilsulfato de Sódio			
Hidróxido de sódio			
Ácido Fosfórico (H ₃ PO ₄) PA			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	ÁGUA DESTILADA
Laurilsulfato de Sódio		
Hidróxido de sódio		
Ácido Fosfórico (H ₃ PO ₄) PA		
Azul de bromotimol		

NEUTRALIZAÇÃO

SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B
1 ml	
2 ml	
3 ml	
4 ml	
5 ml	
6 ml	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO INDICADOR
DE pH PARA O MÉTODO DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Azul de bromotimol			
Purpura de Bromocresol			
Álcool Etílico Comercial 95°			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Azul de bromotimol	
Purpura de Bromocresol	
Álcool Etílico Comercial 95°	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 3- CONTROLE DO REAGENTE "A" PARA O MÉTODO DE CORPER-STONER

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Na ₃ PO ₄ .12 H ₂ O			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Na ₃ PO ₄ .12 H ₂ O	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 4- CONTROLE DO REAGENTE "B" PARA O MÉTODO DE CORPER-STONER

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Na H ₂ PO ₄			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Na H ₂ PO ₄	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--

RESPONSÁVEL

--

FICHA 9- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO ENRIQUECIMENTO ADC

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Catalase			
Dextrose			
Albumina Fração V			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	ÁGUA DESTILADA
Catalase		
Dextrose		
Albumina Fração V		

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL



Capítulo 5

IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIA

5.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem *Actinomycetales*, Subordem *Corynebacterineae* Família *Mycobacteriaceae*, sendo *Mycobacterium tuberculosis* a espécie-tipo do Gênero *Mycobacterium*, que apresenta aproximadamente 100 espécies descritas. Esse é constituído por bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo de 1 a 10 micrômetros de comprimento por 0,2 a 0,6 micrômetros de largura, sendo a propriedade morfotintorial do álcool-ácido resistência a mais importante desse gênero. O alto conteúdo lipídico da sua parede celular, que pode atingir até 40 % do peso seco das células, é responsável por importantes efeitos biológicos no hospedeiro, como a indução da formação de granuloma, atividade adjuvante, indução da formação de zona eletrotransparente, antigenicidade etc. A maioria das espécies é cultivada *in vitro* e não requer fatores de crescimento para sua nutrição, sendo o glicerol e a asparagina as principais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Algumas espécies patogênicas apresentam exigências nutritivas como o caso de *M. hemophilum* em relação à hemina ou hemoglobina, e outras são incultiváveis, como é o caso de *M. leprae*. De modo geral as células apresentam crescimento lento, sendo que *M. tuberculosis* tem o tempo de geração de 18 horas em meio de Lowenstein Jensen (LJ). A maioria das micobactérias de interesse humano e animal tem como temperatura ótima de crescimento 35/37°C. São resistentes às ações de agentes químicos, mas sensíveis à ação de agentes físicos, como a radiação ultravioleta e o calor. São aeróbias ou microaerófilas. A pigmentação que algumas espécies de micobactérias apresentam é determinada pela síntese de β -carotenos.

5.2- ESPÉCIES DE INTERESSE EM PATOLOGIA HUMANA

M. tuberculosis é a espécie cultivável de maior importância médica por ser o principal agente etiológico da tuberculose, e, juntamente com *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* formam o “Complexo” *M. tuberculosis*. A inclusão de outras espécies no complexo ainda está em discussão. Embora outras espécies patogênicas e potencialmente patogênicas sejam isoladas em uma frequência baixa em nosso meio, é importante que laboratórios de referência possam identificá-las corretamente para orientar o tratamento. As micobactérias “não tuberculosas” (MNT) mais isoladas no Brasil são as do “Complexo” *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* e *M. abscessus* e causam principalmente doença pulmonar e ganglionar. Essas e outras formas têm sido encontradas em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência adquirida, sendo que esse grupo contribui hoje com a metade da casuística das micobacterioses no Brasil. Outras espécies de interesse humano têm sido isoladas em algumas regiões do mundo como *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. szulgai*, *M. hemophilum*, *M. malmoense*, *M. africanum*, mas até o momento são pouco conhecidas no nosso meio.

Como essas espécies podem ser isoladas também do meio ambiente (solo, água, etc.) deve-se ter cautela em atribuir a elas a responsabilidade pela etiologia da doença. Para tal é necessário que se isole repetida e sucessivamente a espécie em meio de cultura (pelo menos 3 isolamentos), com crescimento superior a 20 colônias ou isolamento a partir de material de lesão fechada. O isolamento de *M. tuberculosis* mesmo em cultura mista com outra espécie exclui a possibilidade de uma micobacteriose.

5.3- BIOSSEGURANÇA

Estes testes de identificação de micobactérias deverão ser executados assepticamente em área de biossegurança NB3 em cabine de segurança biológica Classe II B2 ou B3. O operador deverá estar utilizando equipamentos de proteção individual como luva, respirador N 95/99, avental descartável, pipetador automático para o manuseio de culturas de microrganismos.

Ao preparar os reagentes químicos, os técnicos deverão observar as recomendações contidas no capítulo “BIOSSEGURANÇA”, já que para cada produto químico existe recomendação específica quanto ao uso de EPIs. Após a execução de cada teste, o material deverá ser colocado em recipiente de aço com tampa para ser esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O conteúdo dos frascos poderá ser descartado no esgoto da pia, sob água corrente ou obedecendo ao plano de rejeitos do LACEN.

5.4- IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Em 1958, Runyon propôs uma divisão das micobactérias mais freqüentemente isoladas no laboratório, baseada em características simples de serem observadas: o tempo de crescimento e a pigmentação das colônias. Originalmente constava de 4 grupos e não incluía as espécies típicas como *M. tuberculosis* e as não cultiváveis como *M. leprae*.

GRUPO	DESCRIÇÃO
I - FOTOCROMOGÊNICAS	Crescimento lento. Colônias não pigmentadas que adquirem cor que pode variar do amarelo ao laranja quando expostas à luz.
II - ESCOTOCROMOGÊNICAS	Crescimento lento. Colônias adquirem cor que pode variar do amarelo ao laranja quando cultivadas na ausência ou na presença da luz.
III - NÃO CROMOGÊNICAS	Crescimento lento. Colônias geralmente não pigmentadas (cor creme).
IV - CRESCIMENTO RÁPIDO	Desenvolvem colônias nos meios de cultura em 7 dias ou menos. Podem ser pigmentadas ou não.

Essa classificação é ainda de grande utilidade e, juntamente com as provas de crescimento em presença de agentes inibidores, permitem constituir grupamentos preliminares antes da escolha dos testes bioquímicos para a identificação em espécies, dentro de cada grupo.

A seguir se descreverá uma metodologia básica para se identificarem os principais membros do “Complexo” *M.tuberculosis* (grupo 0) e as demais espécies de interesse médico e epidemiológico no Brasil, grupadas de acordo com as propriedades de tempo de crescimento e presença de pigmentação (grupos de I a IV). Ver tabela 1 anexa “Identificação das Micobactérias Mais Importantes Clinicamente”.

Existem outros métodos, que são utilizados, para a identificação de micobactérias. Alguns se baseiam em características fenotípicas e outras genotípicas. Entre os primeiros se destaca o estudo dos ácidos micólicos, que se encontram na parede celular de todas as micobactérias. A análise desses ácidos é efetuada através de cromatografia, sendo que a de camada fina já vem sendo usada há muitos anos, conjuntamente com os testes culturais e bioquímicos, para auxiliar na identificação final. A cromatografia gasosa e a líquida são metodologias mais sofisticadas, que se propõem a identificar todas as espécies micobacterianas. O HPLC, iniciais em inglês de cromatografia líquida de alta performance, foi incorporada na rotina de testes de identificação do CDC (Centers for Disease Control

and Prevention) dos Estados Unidos, em 1989, e em 1990 foi colocada como teste padrão para identificação naquele Centro. Entre os testes genéticos ou moleculares, existem testes comerciais ou não. Os comerciais mais utilizados são o GEN-PROBE, que tem como molécula alvo o RNA ribossomal e o INNO-LIPA. São técnicas com o resultado final rápido, relativamente simples, mas que identificam um número limitado de espécies. Entre os métodos não comerciais, o que mais tem chamado a atenção dos micobacteriologistas nos últimos anos é o PRA, que foi descrito em 1993, e se baseia no PCR (iniciais em inglês de reação da polimerase em cadeia) do gen que codifica a proteína 65-KDa, e análise de enzimas de restrição do produto gerado pelo PCR, através de eletroforese. Essa técnica tem se mostrado importante com o método de apoio na identificação de micobactérias, e na caracterização de novas espécies.

Outra metodologia que é utilizada tanto na identificação de espécies quanto em estudos filogenéticos é o seqüenciamento genético. Este método consiste na amplificação, através de PCR, do gen que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, seguido de seqüenciamento do mesmo. A identificação acontece pela comparação com seqüências de referência. Esta metodologia é considerada padrão-ouro nos países desenvolvidos.

É importante salientar que nenhuma dessas técnicas, isoladamente, é capaz de identificar todas as espécies de micobactérias descritas na literatura. Existem ocasiões em que a conjugação de duas ou mais dessas técnicas se faz necessária para identificação definitiva de uma determinada espécie.

5.5- TEMPO DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTO (3,9)

5.5.1- PRINCÍPIO

As micobactérias podem ser grupadas segundo o tempo de crescimento e a presença de pigmentação ou não, o que motivou Runyon a separá-las em grupos, de acordo com essas propriedades. O tempo de crescimento não deve ser observado de cultivo primário, uma vez que no processo de descontaminação algumas micobactérias de crescimento rápido podem levar mais que uma semana para desenvolver colônias no meio de cultura.

5.5.2- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, semear 0,1 ml da suspensão bacteriana na diluição 10^{-5} segundo padronização para teste de sensibilidade indireto (ver Capítulo 6 TESTE DE SENSIBILIDADE DE *M. tuberculosis* AOS ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS) em 2 tubos de LJ cobertos com papel alumínio. Incubar em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.5.3- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Verificar crescimento visível, diariamente durante 7 dias e depois até completar 4-6 semanas. Quando for observado crescimento registrar a pigmentação desenvolvida e expor um dos tubos coberto com papel alumínio, à iluminação de lâmpada fluorescente (30 a 60 W), durante 4 horas, numa distância de aproximadamente 30 cm. Afrouxar as tampas dos tubos, pois o oxigênio é indispensável à síntese de pigmentos carotenóides. Reincubar “overnight” e observar a pigmentação desenvolvida após esse período comparando com o tubo que não foi exposto à luz. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.5.4- RESULTADO

TUBO COBERTO	TUBO EXPOSTO À LUZ	CROMOGENICIDADE	CONTROLE DE QUALIDADE	
			POSITIVO	NEGATIVO
sem pigmento	sem pigmento	não cromogênica grupo III	<i>M. terræ</i>	<i>M. gordonæ</i>
com pigmento	com pigmento	escotocromogênica grupo II	<i>M.gordonæ</i>	<i>M. terræ</i>
sem pigmento	com pigmento	fotocromogênica grupo I	<i>M. kansasii</i>	<i>M. terræ</i>

5.6- CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AGENTES INIBIDORES (7, 9, 24)

5.6.1- INDICAÇÃO

Estes testes são utilizados na identificação das espécies micobacterianas:

- o ácido p-nitrobenzóico (PNB-500 µg/ml) separa os membros do “Complexo” *M.tuberculosis*, que são sensíveis, das demais micobactérias, que são resistentes, excetuando algumas estirpes de *M.kansasii*, *M.gastri*, *M. gordonæ* e *M.marinum*;
- a hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH -2 µg/ml) separa *M. tuberculosis*, que é resistente ao contrário dos demais membros do “Complexo” *M.tuberculosis*, que são sensíveis.

NOTA: Esses dois agentes identificam *M. tuberculosis* em 20 dias, quando se semeia diretamente escarro positivo a baciloscopia, em meio de cultura contendo esses inibidores.

- a cicloserina (CS -30 µg/ml) separa *M.bovis* (BCG), que é resistente, dos demais membros do “Complexo” *M. tuberculosis*. Além de ser útil na separação de *M.szulgai*, que é resistente, das demais escotocromogênicas;
- o ofloxacina (OFLO-2 µg/ml) é utilizado para separar “Complexo” *M. fortuitum*, que é sensível, do “Complexo” *M.chelonæ*, que é resistente;
- o etambutol (EMB - 2 µg/ml) separa o “Complexo” *M.avium-intracellulare*, que é resistente, das demais espécies não cromogênicas de crescimento lento;
- a pirazinamida (PZA-100 µg/ml) separa *M. bovis* e *M. bovis* (BCG), que são resistentes, de *M.tuberculosis*, que é sensível;
- a hidroxilamina (HX-500 µg/ml) separa “Complexo” *M. fortuitum* e *M.chelonæ*, que são resistentes, do restante das micobactérias de crescimento rápido.

5.6.2- PREPARAÇÃO E TÉCNICA

Semear 0,1 ml de suspensão bacteriana na diluição 10^{-3} da escala de MacFarland em tubos com meio LJ (controle) LJ contendo PNB, TCH, EMB, CS, OFLO e PZA, e HX, como descrito no Capítulo 6. Anotar a preparação das drogas na ficha 2 “ Controle dos reagentes para crescimento em presença de agentes inibidores”.

5.6.3- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

A leitura deve ser efetuada como no teste de sensibilidade considerando-se 1% a proporção crítica para todas as drogas, excetuando-se a pirazinamida que é de 10%. Anotar os resultados na ficha 3 “Resultado de Leitura de Crescimento em Presença de Agentes Inibidores” (anexa).

5.6.4- CONTROLE DE QUALIDADE

Para o controle de qualidade são utilizadas todas as cepas descritas no item 5.6.1.

5.7- CRESCIMENTO EM GELOSE NUTRITIVA (7,9)

5.7.1- INDICAÇÃO

Esta prova é utilizada para separar as espécies de crescimento lento daquelas de crescimento rápido.

5.7.2- PREPARAÇÃO

5.7.2.1- Meio de Cultura

Preparar Agar nutriente segundo recomendação do fabricante.

Distribuir volumes de 5ml em tubos de rosca 20 x 150 mm. Autoclavar a 121°C por 15 minutos e inclinar. Anotar a preparação na ficha 4 “Controle de Produção de Meio de Gelose Nutritiva”.

5.7.3- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, fazer uma suspensão padronizada como para teste de sensibilidade (ver Capítulo 6) e semear 0,1ml da diluição 10^{-3} , nos tubos contendo o meio de gelose. Incubar em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Fazer leituras diárias até o sétimo dia e depois semanalmente até completar 4 semanas. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.7.4- LEITURA

Positiva: Crescimento de colônias (+ a +++), conforme descrito no Capítulo 4 “Cultura”.

5.7.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. fortuitum*

Negativo: *M. tuberculosis*

5.8- CRESCIMENTO EM AGAR MacCONKEY (3,14)

5.8.1- INDICAÇÃO

Este meio é à base de sais biliares, que são agentes inibidores, e funciona como meio seletivo para micobactérias, pois a maioria das espécies não cresce, excetuando-se os “Complexos” *M. fortuitum* e *M. chelonae*.

5.8.2- PREPARAÇÃO

5.8.2.1- Meio de Cultura

Dissolver o meio desidratado em água (agar MacConkey sem cristal violeta), segundo a recomendação do fabricante. Aquecer até a completa dissolução do agar. Distribuir em volumes de 5 ml em tubos de rosca 20 x 150 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Inclinar os tubos e deixar esfriar. Anotar na ficha 5 “Controle de Produção de Meio MacConkey Sem Cristal Violeta”.

5.8.3- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, fazer uma suspensão padronizada como para teste de sensibilidade (ver capítulo) e semear 0,1ml da diluição 10^{-3} no tubo com o meio teste. Incubar em estufa a 28°C, $\pm 1^\circ\text{C}$, por 11 dias.

5.8.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Fazer a leitura com 5 e 11 dias de incubação. O teste é positivo quando ocorre crescimento em toda extensão da área semeada, com alteração ou não da coloração do meio de cultura. O teste é negativo quando há ausência de crescimento, e não se considera positivo a ocorrência de colônias na parte inferior do meio da cultura, onde o inóculo é mais denso. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.8.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. fortuitum* ou *M. chelonae*

Negativo: *M. phlei*

5.9- CRESCIMENTO EM MEIO COM CLORETO DE SÓDIO A 5% (5,9)

5.9.1- PRINCÍPIO

A maioria das micobactérias de crescimento rápido cresce em meio contendo o cloreto de sódio. A incapacidade de *M. chelonae* crescer neste meio facilita sua distinção do “Complexo” *M. fortuitum*.

5.9.2- PREPARAÇÃO

Adicionar o cloreto de sódio à base de Lowenstein Jensen de modo que este meio fique na concentração final de 5% (10 g em 200 ml da base do meio total). Distribuir o meio em volumes de 5 ml, em tubos de rosca 20 x 150 mm. Coagular a 80°C, por 40 a 45 minutos. Anotar na ficha 6 “Controle da Preparação do Meio de Lowenstein Jensen com NaCl”.

5.9.3- TÉCNICA

Fazer uma suspensão bacteriana que corresponda ao tubo nº 1 da escala MacFarland (ver Capítulo 6). Semear 0,1ml em um tubo de Lowenstein-Jensen com NaCl e um de Lowenstein Jensen sem NaCl (controle). Incubar a 36°C ± 1°C. Fazer a leitura com 7e 14 dias até 4 semanas (leitura final). Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

Em caso de micobactérias de crescimento lento, semear 0,1 ml da diluição 10⁻³ da escala MacFarland (ver Capítulo 6).

5.9.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: Crescimento no tubo controle e no tubo com NaCl. Se mais de 50 colônias se desenvolverem no meio com NaCl em até 4 semanas, o teste é positivo. O inóculo no tubo controle deve fornecer numerosas colônias no mesmo período de tempo.

Negativa: Crescimento somente no tubo controle.

5.9.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. fortuitum*

Negativo: *M. chelonae*

5.10- PRODUÇÃO DE NIACINA (3,12)

5.10.1- PRINCÍPIO E INDICAÇÃO

A niacina desempenha um papel vital nas reações de oxidação-redução que ocorrem durante as sínteses metabólicas em todas as micobactérias. Ela funciona com um precursor na biossíntese de coenzimas. Embora todas as micobactérias produzam ácido nicotínico, estudos comparativos têm mostrado que, devido a um bloqueio de uma via metabólica, *M. tuberculosis* acumula uma quantidade maior e a detecção dessa niacina acumulada é útil no diagnóstico deste microrganismo. O teste de niacina pode ser utilizado isoladamente para identificar *M. tuberculosis*, embora algumas estirpes de *M. simiae*, *M. africanum* e *M. chelonae* possam dar resultado positivo.

5.10.2- PREPARAÇÃO

Utilizam-se fitas impregnadas com reativos, disponíveis comercialmente.

5.10.2.1- Solução Salina a 0,85%

Dissolver 0,85 g de cloreto de sódio em 100 ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos

5.10.3- TÉCNICA

- antes da realização do teste, verificar se as culturas têm pelo menos 4 semanas de crescimento em meio à base de ovo e no mínimo 50 colônias. Uma vez que o microrganismo excreta niacina no meio de cultura, cortar levemente a superfície do meio com uma alça bacteriológica para assegurar que o líquido entre em contato com o meio de cultura e extraia a niacina aí presente;
- adicionar 1,5 ml de água destilada estéril ou solução salina sobre a cultura a ser testada;
- colocar os tubos horizontalmente de modo que o líquido cubra toda a superfície do meio;
- deixar no mínimo 15 minutos para haver a extração da niacina. Esse tempo pode ser maior quando a cultura tem poucas colônias ou quando o microrganismo testado é conhecidamente um fraco produtor de niacina. Os tubos podem ser colocados em estufa a 36°C para acelerar a extração;

OBS: As culturas crescidas em meio à base de ovo fornecem resultados mais satisfatórios. Se for necessário usar culturas, crescidas em meio de 7H-10 ou 7H-11, usar o meio suplementado com aspartato de potássio a 0,1% ou aumentar o tempo de extração (2 horas em estufa a 36°C ± 1°C);

- remover 0,6 ml do líquido extrator para um tubo com tampa de rosca de 13x100mm.
- colocar a fita num tubo com água. Observar o aparecimento de cor amarela até um máximo de 30 minutos. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo;

5.10.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: Desenvolvimento de cor amarela.

Negativa: Não há mudança de cor.

5.10. 5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. tuberculosis*

Negativo: *M. avium*

5.11- REDUÇÃO DO NITRATO (25)

5.11.1- INDICAÇÃO

Separar *M. tuberculosis* (positivo) das outras espécies do “Complexo” *M. tuberculosis*. Além disso separar o “Complexo” *M. fortuitum* (positivo) do “Complexo” *M. chelonae* (negativo). É útil na identificação de *M. kansasii*.

5.11.2- SOLUÇÕES

5.11.2.1- Solução Substrato

(solução de nitrato de sódio 0,01 M em tampão fosfato 0,022 M, pH 7,0)

Nitrato de sódio	0,085g
KH_2PO_4	0,117g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0,485g
Água destilada	100ml

Dissolver os sais em 100 ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Anotar toda a preparação na ficha 7 “Controle de Preparação da Solução Substrato Para a Prova da Redução do Nitrato” (ver anexo).

5.11.2.2- Reativos

- reativo nº1 - Adicionar cuidadosamente 50ml de HCL concentrado em 50ml de água destilada. ADICIONAR O ÁCIDO SOBRE A ÁGUA;
- reativo nº2 - Dissolver 0,2 g de sulfanilamida em 100 ml de água destilada;
- reativo nº3 - Dissolver 0,1g de hidrocloreto de N-naftiletilenodiamina em 100 ml de água destilada. Guardar em refrigerador o substrato e os reativos em frasco escuro. Desprezar os reativos se houver mudança de cor ou formação de precipitado;

Anotar toda a preparação na ficha 8 “Controle de Preparação dos Reagentes Reveladores da Prova da Redução do Nitrato”.

5.11.2.3- Escala Padrão Para Leitura

Preparar as seguintes soluções estoques (ver esquema 1, anexo):

- nº1 - Na_2HPO_4 M/15 (1,1864g em 100 ml de água destilada q.s.p.);
- nº2 - KH_2HPO_4 M/15 (0,90726g em 100 ml de água destilada q.s.p.);
- nº3 - $\text{Na}_3\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ M/15 (3,047 em 100 ml de água destilada q.s.p.);
- nº4 - fenolftaleína a 1% (1g em 100 ml de álcool etílico comercial a 95°);
- nº5 - azul de bromotimol a 1% (1g em 100 ml de álcool etílico comercial a 95°); Anotar na ficha 9 “Controle da Preparação do Azul de Bromotimol a 1%”

- n°6 - azul de bromotimol a 0,01% (misturar 1,0ml da solução estoque n°5 com 100ml de água destilada).
- preparar um tampão pela mistura de: 35ml da solução estoque n°1, 5ml da solução estoque n°2 e 100ml da solução estoque n°3. Colocar numa estante 8 tubos de rosca 13 x 100mm, numerados de 1 a 8. Distribuir 2ml do tampão nos 7 primeiros tubos;
- preparar uma mistura composta por 10ml do tampão, 0,1ml da solução estoque n°4, 0,2ml da solução estoque n°6 e transferir 2ml dessa solução ao tubo n°8, que corresponderá ao tubo 5+ na escala padrão; e 2ml ao tubo n°1; homogeneizar e transferir 2ml para o tubo n°2, e assim sucessivamente até o tubo n°7, desprezando os 2ml excedentes deste tubo. A escala padrão de leitura para o teste da redução do nitrato corresponderá a:
 - tubo n°7 (+/-)
 - tubo n°5 (1 +)
 - tubo n°4 (2 +)
 - tubo n°2 (3 +)
 - tubo n°1 (4 +)
 - tubo n°8 (5 +)

Esta escala deverá apresentar uma faixa de coloração variando do róseo-claro até o vinho. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos, lacrar e estocar em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. Anotar na ficha 10 “Controle da Preparação dos Reagentes Para Leitura da Prova da Redução do Nitrato”.

5.11.3- TÉCNICA

- adicionar 0,2ml de água destilada estéril em tubos 13x100mm;
- a partir de um cultivo recente em meio solidificado emulsionar duas alças de crescimento em água destilada;
- adicionar 2,0ml de NaNO_3 (substrato) aos tubos;
- agitar manualmente e incubar por 2 horas em banho-maria ou estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- retirar o tubo do banho-maria;
- adicionar 1 (uma) gota de reativo n° 1;
- adicionar 2 (duas) gotas de reativo n° 2;
- adicionar 2 (duas) gotas de reativo n° 3;
- observar imediatamente a formação de cor rosa ao vermelho.

5.11.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: Pode variar do rosa pálido (+/-) ao vermelho intenso (5+) quando comparado com a cor dos padrões. Considerar positivo o tubo com cor a partir de 3+.

Negativa: Nenhuma cor. Se não há aparecimento de cor, o teste pode ser negativo ou a redução se processou além do nitrito formando N_2 . Adicionar uma pequena quantidade de zinco em pó a todos os testes negativos.

Se o nitrato ainda estiver presente, ele será reduzido cataliticamente pelo zinco, e se desenvolverá cor vermelha, indicando que o teste é verdadeiramente negativo.

Se não há desenvolvimento de cor quando é adicionado, significa que a reação original era positiva, ou seja, o nitrato foi reduzido a nitrito e este último foi também reduzido a N_2 . Como o teste verifica a presença do nitrito, não há desenvolvimento de cor, embora a redução do nitrato tenha ocorrido. Nesse caso, o teste é considerado como positivo e é aconselhável que se repita o teste para confirmar a observação. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.11.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M.tuberculosis* (3+ a 5+)

Negativo: *M.bovis* ou tubo não inoculado

5.12- CATALASE A 68°C (13)

5.12.1- INDICAÇÃO

A catalase é uma enzima intracelular e solúvel, capaz de clivar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Virtualmente, todas as micobactérias possuem esta enzima, exceto certas estirpes mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida e *M. bovis*. Vários estudos têm demonstrado que as micobactérias possuem tipos de catalase que variam em relação à estabilidade ao calor. O “Complexo” *M. tuberculosis* pode ser separado das demais micobactérias, por apresentar catalase que se inativa pelo calor.

5.12.2- SOLUÇÕES

5.12.2.1- Solução de Tampão Fosfato M/15, pH 7,0 segundo Soerensen

Ver preparação no Capítulo 10 “SOLUÇÕES E REAGENTES. MATERIAL DO LABORATÓRIO”. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir volumes de 0,5 ml em tubos 13 x 100 mm, quando for realizar a prova.

5.12.2.2- Peróxido de Hidrogênio a 30% ou 110 volumes (Superoxol, Perhidrol)

5.12.2.3- Solução de TWEEN 80 a 10%

Dissolver 10ml de TWEEN 80 em 90 ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 10 minutos. Anotar na ficha 11 “Controle da Preparação do TWEEN 80 Para a Prova da Catalase”.

5.12.2.4- Solução Reveladora

Imediatamente antes do uso, misturar partes iguais de TWEEN 80 a 10% e peróxido de hidrogênio.

Anotar todas estas etapas na ficha 12 “Controle da Preparação dos Reagentes Para a Prova da Catalase” (ver anexo).

5.12.3- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, emulsionar uma alça cheia de crescimento em 2 tubos contendo 0,5 ml de tampão fosfato. Colocar um dos tubos em banho-maria a 68°C por 20 minutos e o outro em temperatura ambiente (tubo controle). Retirar o tubo do banho-maria e deixar esfriar. Adicionar 0,5 ml da solução reveladora nos 2 tubos. Observar a formação de bolhas e considerar o tempo de leitura até 20 minutos. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.12.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: Formação de bolhas nos 2 tubos (catalase termoestável)

Negativa: Formação de bolhas apenas no tubo controle (catalase termolábil)

IMPORTANTE: Não agitar os tubos para fazer a leitura, pois o TWEEN 80 forma bolhas.

5.12.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Negativo: *M.tuberculosis*

Positivo: *M.kansasii*

5.13- BETA-GLICOSIDASE (16)

5.13.1- INDICAÇÃO

Esta prova é utilizada para separar o “Complexo” *M.chelonae* (negativo) do “Complexo” *M.fortuitum* (positivo) que hidroliza enzimaticamente o substrato, liberando p-nitrofenol.

5.13.2- SOLUÇÕES

5.13.2.1- Solução Substrato

Pesar em balança de precisão 300 mg de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo e dissolvê-lo em 100ml de tampão TRIS (hidroximetilaminometano) 0,05 M, pH 7,0. A solução obtida é incolor e pode ser conservada por duas semanas em geladeira a ± 4°C, aproximadamente. Anotar a preparação na ficha 13 “Controle da Preparação dos Reagentes Para a Prova da Beta-glicosidase”.

5.13.2.2- Solução de Tampão TRIS a 0,05 M

Pesar em balança de precisão 0,6057g de tampão TRIS e dissolvê-lo em 100ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Anotar a preparação na ficha 14 “Controle da Preparação do Tampão Para a Prova Beta-glicosidase”.

Ver esquema 2 “Preparação dos Reativos da β -glicosidase” anexo.

5.13.3- TÉCNICA

Distribuir 0,5 ml do substrato em tubos de ensaio com rosca 13 x 100mm. A partir de um cultivo recente em meio solidificado, emulsionar uma alça do crescimento na solução substrato. Incubar em estufa a 36°C \pm 1°C. durante 3 horas. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.13.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: aparecimento de cor amarela

Negativa: não há alteração de cor

5.13.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. fortuitum*

Negativo: *M. chelonae*

5.14- HIDRÓLISE DO TWEEN 80 (11, 26)

5.14.1- INDICAÇÃO

A hidrólise enzimática do TWEEN 80 (com poucas exceções) é utilizada para separar as espécies potencialmente patogênicas (negativas) das comumente saprófitas (positivas) entre as escotocromogênicas e não cromogênicas de crescimento lento.

5.14.2- PRINCÍPIO

A coloração âmbar que o meio adquire é devida à presença do TWEEN 80, que alcaliniza o meio. Se a micobactéria, através de uma esterase, utilizar o TWEEN 80, ocorrerá a acidificação do meio, neutralizando-o, revertendo a cor do vermelho neutro em pH 7,0 (rosa ou vermelho) e o resultado é positivo.

5.14.3- SOLUÇÕES

5.14.3.1- Solução Substrato

Tampão fosfato M/15, pH 7,0 segundo Soerensen*	100ml
TWEEN 80	0,5ml
Solução aquosa de vermelho neutro a 0,1%	2,0ml

* Ver preparação detalhada no Capítulo 10 SOLUÇÕES E REAGENTES. MATERIAL UTILIZADO NO LABORATÓRIO. Anotar a preparação do vermelho neutro a 0,1% na ficha 15 “Controle da Preparação da Solução do Vermelho Neutro a 0,1%”.

Diluir o TWEEN 80 no tampão fosfato e somente depois juntar a solução de vermelho neutro. Distribuir volumes de 2,0ml em tubos de rosca 13 x 100mm. Esterilizar em autoclave a 121°C por 10 minutos. Após autoclavação a solução apresentará coloração âmbar. Conservar em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, aproximadamente ao abrigo da luz até no máximo duas semanas. Anotar na ficha 16 “Controle da Preparação do Substrato Para a Prova da Hidrólise do TWEEN 80”.

5.14.4- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, emulsionar uma alça de crescimento na solução substrato. Incubar em estufa a 36°C até 10 dias.

5.14.5- LEITURA

A leitura é feita após 1, 5 e 10 dias de incubação. NÃO AGITAR OS TUBOS DURANTE A LEITURA. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

Positiva: Observar a mudança de cor da solução de âmbar para rosa ou vermelho. NÃO CONSIDERAR COMO POSITIVO A COLORAÇÃO RÓSEA DA MASSA BACTERIANA DEPOSITADA NO FUNDO DO TUBO.

5.14.6- CONTROLE DE QUALIDADE

Negativo: *M. bovis* (BCG) ou *M. avium* ou tubo não semeado.

Positivo: *M. kansasii*

5.15- CAPTAÇÃO DO FERRO (9, 22)

5.15.1- INDICAÇÃO

É indicado para separar *M. chelonae* (negativo) de *M. fortuitum* (positivo). Esta espécie acumula óxido de ferro tornando as colônias amarronzadas.

5.15.2- PREPARAÇÃO

Adicionar o citrato férrico amoniacal na base autoclavada do LJ, de modo que fique na concentração final de 2,5 % (5 g para 200ml de meio total). Distribuir em tubo de rosca 20 x 150mm., em volume de 5ml. Coagular a 80°C durante 45 minutos. Anotar na ficha 17 “Controle da Preparação do Meio Lowenstein Jensen com Citrato Ferrico Amoniacal”.

5.15.3- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, preparar uma suspensão bacteriana e semear 0,1ml da diluição 10^{-3} , segundo a padronização para teste de sensibilidade indireto (ver Capítulo 6). Incubar em estufa a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com tampa afrouxada durante 4 semanas.

5.15.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: colônias marrons

Negativa: sem crescimento ou crescimento de colônias sem coloração amarronzada. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.15.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. fortuitum*

Negativo: *M. chelonae*

5.16- UREASE (9, 23)

5.16.1- INDICAÇÃO E PRINCÍPIO

A capacidade das micobactérias em hidrolisar uréia e liberar amônia, alcalizando o meio, é útil na identificação das espécies escotocromogênicas e não cromogênicas e na identificação de *M. bovis* (BCG) que apresenta reação fortemente positiva.

5.16.2- PREPARAÇÃO

Utiliza-se disco uréia disponível comercialmente.

5.16.3- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, emulsionar uma alça de crescimento em 0,5 ml de H₂O destilada em tubos de rosca de 13 x 100mm. Introduzir o disco uréia. Incubar em estufa a 36°C, mais ou menos 1°C. Ler com 2 e 24 horas. Quando a leitura é feita com 2 a 3 dias dificulta a identificação final. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.16.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: Aparecimento de cor rosa escuro.

Negativa: Nenhuma mudança de cor ou rosa pálido, ou um leve tom alaranjado.

5.16.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M.scrofulaceum*, *M. bovis* (BCG)

Negativo: Tubo não inoculado ou *M.terra*.

5.17- UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES (INOSITOL- MANITOL- CITRATO DE SÓDIO) (20, 24)

5.17.1- INDICAÇÃO

A capacidade das micobactérias em utilizar açúcares como única fonte de carbono é útil na diferenciação entre *M. fortuitum*, *M.peregrinum*, *M.chelonæ* e *M.abscessus*.

5.17.2- PREPARAÇÃO

5.17.2.1- Meio Base

Sulfato de amônio	1,05g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20g
KH ₂ PO ₄	0,20g
Agar	8,0g
Água destilada	400,0ml

Preparar a solução de sais em água destilada (sem o agar) e ajustar o pH para 7,0 com KOH ou HCl a 10%. Adicionar o agar. Aquecer o meio base até a completa dissolução do agar. Distribuir volumes de 4ml em 25 tubos de rosca 16 x 150mm (meio controle). Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Inclinar os tubos e deixar esfriar.

Dividir o restante do meio em 3 alíquotas de 100ml cada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Deixar esfriar até atingir 45°C. A cada alíquota do meio, adicionar 5ml da solução de açúcar previamente preparada e esterilizada por filtração em membrana filtrante. Distribuir asépticamente volumes de 5 ml em tubos de rosca 20 x 150mm estéreis. Inclinar os tubos. Anotar na ficha 18 “Controle da Preparação do Meio de Cultura Para a Prova da Utilização de Açúcares”.

Ver esquema 3 “Preparação do Meio Para Utilização dos Açúcares” anexo.

5.17.2.2- Solução de Açúcares

5.17.2.2.1- Solução de Inositol ou Manitol

Inositol ou manitol	1,5g
água destilada	15ml

Dissolver o açúcar na água. Filtrar em membrana filtrante esterilizante. A concentração final de inositol/manitol no meio é de 0,5%.

5.17.2.2.2- Solução de Citrato de Sódio

citrato de sódio	1,8g
água destilada	15ml

Dissolver o açúcar na água. Filtrar em membrana filtrante esterilizante. A concentração final do citrato no meio é de 0,6%.

Anotar na ficha 19 “Controle da Preparação da Solução dos Açúcares”.

5.17.3- TÉCNICA

A partir de um cultivo em meio líquido de 7H9 incubado em estufa de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por uma semana, fazer uma diluição de 10^{-1} e semear 0,1ml no tubo com açúcar e no tubo controle (sem açúcar). Incubar a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ler com 7 até 14 dias.

5.17.4- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: crescimento somente no tubo com açúcar. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.17.5- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M.peregrinum* - manitol
M.chelonæ - citrato de sódio
M.porcinum - inositol
Negativo: *M. fortuitum*

5.18- REDUÇÃO DO TELURITO DE POTÁSSIO (10)

5.18.1- PRINCÍPIO DO TESTE

Durante o pico de crescimento do cultivo em meio líquido, as micobactérias reduzem telurito de potássio em proporções variadas. O telurito atua como acceptor artificial de elétrons e é reduzido a telúrio metálico (preto) nos sítios de atividade de oxi-redução nas células bacterianas.

5.18.2- INDICAÇÃO

Separar o “Complexo” *M.avium-intracellulare* (positivo) da maioria das outras espécies não cromogênicas (negativas). O “Complexo” *M.avium-intracellulare* e a maioria das micobactérias de crescimento rápido reduzem telurito em 3 dias.

5.18.3- PREPARAÇÃO

5.18.3.1- Meio Líquido de 7H-9 de Middlebrook.

Preparar de acordo com as instruções do fabricante, 900ml de meio líquido 7H-9 de Middlebrook e suplementar com 0,5ml de TWEEN 80. Não usar glicerol. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos, esfriar até 45°C e assepticamente adicionar 100ml do enriquecimento ADC. Anotar na ficha 20 “Controle de Produção de Meio de Cultura Middlebrook 7H9”.

Distribuir assepticamente 2ml do meio em tubos de rosca 13x100 mm estéreis.

5.18.3.2- Solução de Telurito de Potássio a 0,2%

telurito de potássio	0,1g
água destilada	50ml

Dissolver 0,1 g de telurito de potássio em 50ml de água destilada. Distribuir volumes de 2ml em tubos de ensaio de rosca 13x100mm e esterilizar em autoclave a 121°C durante 10 minutos. Guardar em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. Anotar na ficha 21 “Controle da Preparação do Reagente Para a Prova da Redução do Telurito de Potássio”.

5.18.4- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, semear uma alça do crescimento no meio 7H-9. Incubar em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por somente 7 dias. Se o crescimento não for intenso aos 7 dias, reinocular para meio líquido com uma alça bem cheia de crescimento para um reteste na semana seguinte. O cultivo com crescimento escasso pode ser testado aos 7 dias, mas não reincube por tempo adicional na tentativa de obter um crescimento mais abundante. Todos os tubos inoculados devem ser agitados diariamente para propiciar o crescimento intenso em 7 dias. Adicionar 1 gota de solução de telurito de potássio, assepticamente, a cada cultura-teste e nos controles. Agitar os tubos. Reincubar todas as culturas em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias. Não agitar os tubos durante este período. No terceiro dia de incubação, observar os grumos sedimentados em cada tubo-teste, tomando cuidado de não agitar os tubos. Anotar estes resultados na ficha 1 “Resultados da Identificação Bioquímica”, em modelo anexo.

5.18.5- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positiva: Formação de precipitado preto de telúrio metálico.

Negativa: Células sem precipitado preto. Algumas espécies produzem um precipitado marrom claro ou cinza, que deve ser considerado como negativo.

5.18.6- CONTROLE DE QUALIDADE

Positivo: *M. avium*

Negativo: *M. terrae*

5.19-ARILSULFATASE (9)

5.19.1- INDICAÇÃO

Esta prova auxilia a identificação do “Complexo” *M. fortuitum*, “Complexo” *M. chelonae* e do *M. xenopi* que são positivos.

5.19.2- SOLUÇÕES

5.19.2.1- MEIO LÍQUIDO DE 7H-9 DE MIDDLEBROOK

Preparar de acordo com as instruções do fabricante, 900ml de meio líquido 7H-9 de Middlebrook e suplementar com 0,5ml de TWEEN 80. Não usar glicerol. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos, esfriar até 45°C e assepticamente adicionar 100ml do enriquecimento ADC. Anotar na ficha 20 “Controle de Produção de Meio de Cultura Middlebrook 7H9” (ver anexo).

Distribuir assepticamente 2ml do meio em tubos de rosca 13x100mm estéreis.

5.19.2.2- SOLUÇÃO SUBSTRATO

Dissolver 2,6g de dissulfato de fenoltaleína, sal tripotássio, em 50ml de água destilada. Esterilizar com membrana filtrante esterilizante. Estocar a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Anotar na ficha 22 “Controle da Preparação do Substrato Para a Prova da Arilsulfatase”.

5.19.2.3- SOLUÇÃO REVELADORA (Carbonato de sódio 2N)

Dissolver 5,3g de carbonato de sódio anidro em 50ml de água destilada. Não é necessário esterilizar. Anotar na ficha 23 “Controle da Preparação do Carbonato de Sódio Para a Prova da Arilsulfatase”.

5.19.3- PREPARAÇÃO

Adicionar assepticamente 1,2ml de solução substrato a 100ml de meio 7H9. Distribuir assepticamente 2ml desta solução em tubos de rosca de 13x100mm. Conservar em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, aproximadamente. Anotar na ficha 24 “Controle da Preparação do Meio de Cultura Com Substrato da Arilsulfatase”.

5.19.4- TÉCNICA

A partir de um cultivo recente em meio solidificado, emulsionar uma alça do crescimento na solução contendo o substrato. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 3 dias da incubação adicionar 6 gotas da solução reveladora

5.19.5- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Positivo: Aparecimento de cor que varia do rosa ao vermelho.

Negativo: Não há mudança de cor ou somente um leve tom rosado.

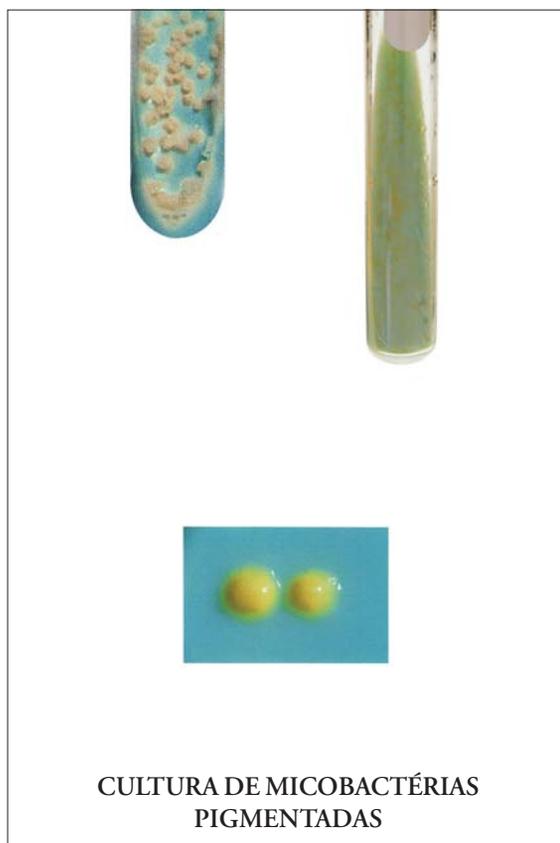
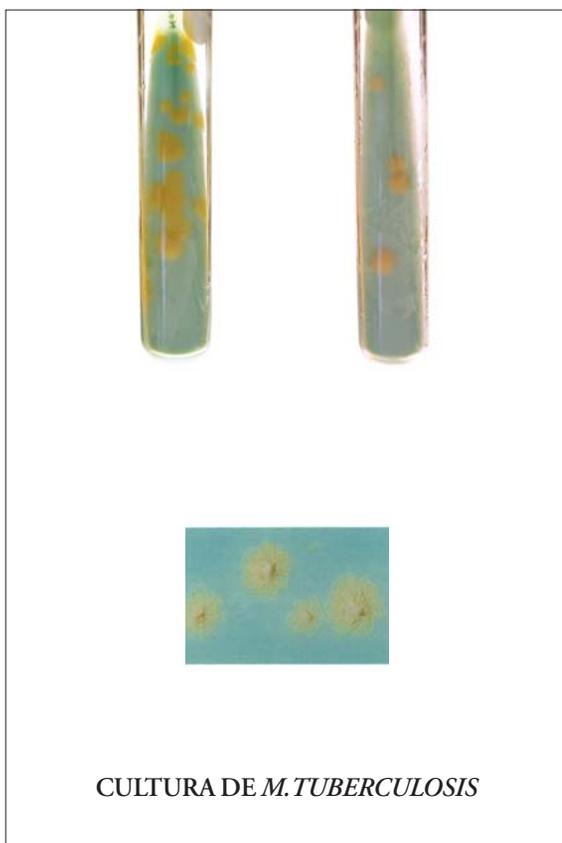
OBS: Considerar como positivo a partir do tubo 3 + da escala do Nitrato. Anotar estes resultados na ficha "Resultados da Identificação Bioquímica", em modelo anexo.

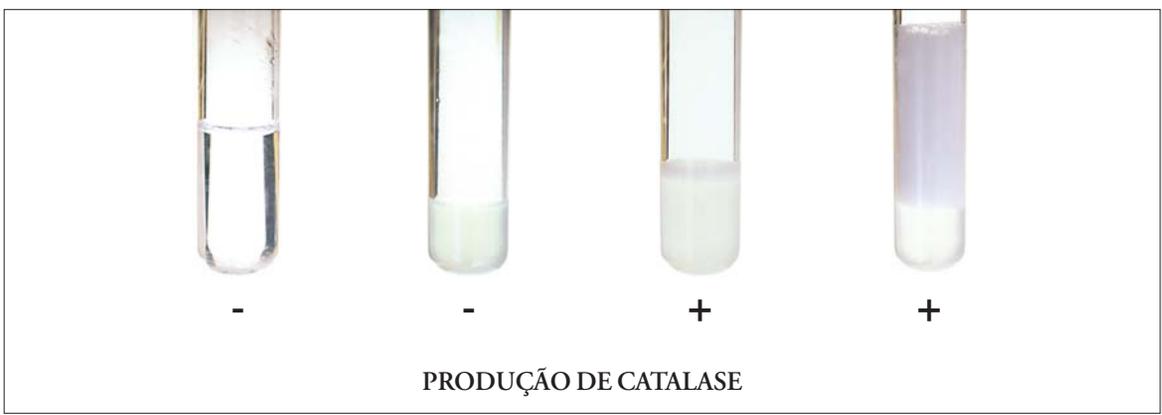
5.19.6- CONTROLE DE QUALIDADE

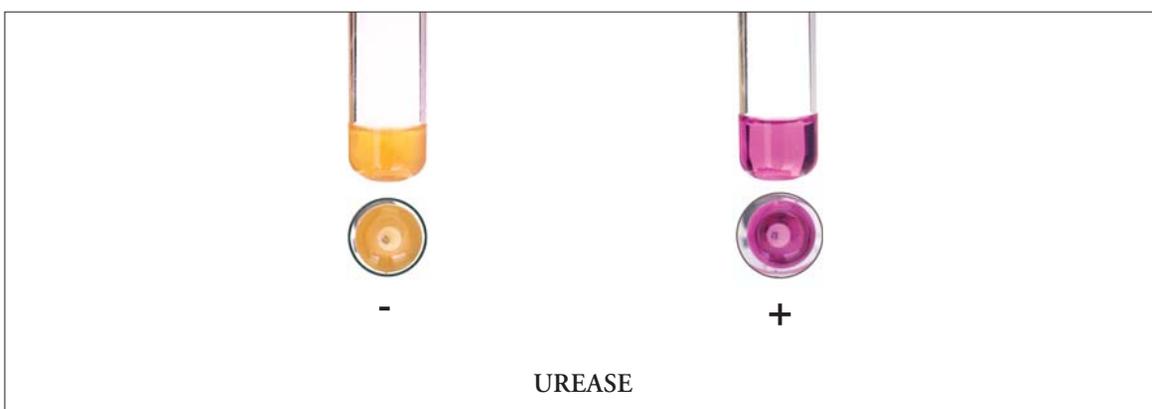
Positivo: *M. fortuitum*

Negativo: *M. avium*

5.20- ILUSTRAÇÕES









5.21- BIBLIOGRAFIA

- 1- BARRETO, AMW; CAMPOS, CED. *Micobactérias "não tuberculosas" no Brasil*. Bol Pneumol Sanit, 2000; 8 (1): 23 - 32.
- 2- BARRETO, AMW; MARTINS, FM; CAMPOS, CED. *Frequência de doença pulmonar crônica nos casos de micobacterioses ocorridos no Brasil no período de 1989 a 1991*. J Pneumol, 1992; 18 (Supl 2): 119.
- 3- BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI/CRPHF - *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 1994. 2ª ed. revisada e ampliada.
- 4- CHEMLAL, K; PORTAELS, F. *Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria*. Curr Opin Infect Dis, 2003; 16: 77-83.
- 5- CONVILLE, PS; WITEBSKY, FG. *Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria*. J Clin Microbiol, 1998; 36:1555.
- 6- DAVID, HL. *Bacteriology of Mycobacterioses*. Centers for Disease Control, Atlanta, 1976, 166 p.
- 7- DAVID, HL; LÉVY-FRÉBAULT, V & Thorel, MF. *Méthods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Paris: Institute Pasteur; 1989.
- 8- FERREIRA, RMC; SAAD, MHF; SILVA, MG; FONSECA, LS. *Non-tuberculous mycobacteria 1: One year clinical isolates identification in tertiary hospital Aids reference center*. Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002; 97: 725-729.
- 9- KENT, PT & KUBICA, GP. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
- 10- KILBURN, JO; SILCOX, VA; KUBICA, GP. *Differential identification of mycobacteria*. V. The tellurite reduction test. Amer Rev Respir Dis, 1969; 99: 4
- 11- KILBURN, JO; O'DONNELL, KF; SILCOX, VA & DAVID, H L. *Preparation of a stable mycobacterial TWEEN hidrolisis test substrate*. Appl Microbiol, 1973; 26: 826.
- 12- KONNO, K. *New chemical method to differentiate human tubercle bacilli from other mycobacteria*. Science, 1956; 24: 985.
- 13- KUBICA, GP & POOL, LG. *Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. I. An attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activity at different temperatures and pH*. Amer Rev Respir Dis, 1960; 81: 387.
- 14- KUBICA, GP & VITVITSKY, J. *Comparison of two commercial formulations on the MacConkey agar test for mycobacteria*. Appl Microbiol, 1974; 27: 917.
- 15- KUSONOKI S & TAKAYUKI E. - Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov.rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 240.
- 16- MEYER, L; DAVID, HL. *Evaluation de l'activité uréase et de l'activité B-glucosidase pour l'identification pratique des mycobactéries*. Ann Microbiol (Institut Pasteur), 1979; 130 :323.
- 17- RASTOGI, N; DAVID, HL. *Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria*. Biochimie 1988; 70: 1101.
- 18- ROBERTS, GD; KONEMAN, EW; KIM, Y K. "Mycobacterium". In: BALLOWS, A; HAUSLER, WJ [ET ALII]. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1991. 5th ed.
- 19- RUNYON, EH; SELIN, M J; HARRIS, HW. *Distinguishing mycobacteria by the niacin test*. Amer Rev Tuberc, 1959; 79: 663.
- 20- SILCOX, VA; GOOD, RC; FLOYD, MM. *Identification of clinically significant Mycobacterium fortuitum complex isolates*. J

Clin Microbiol, 1981;14: 686.

21- STACREBRANDT, E; RAINEY, F; WARD-RAINEY, NL. *Proposal for a New Hierarchic Classification system Actinobacteria classis nov.* Int J Syst Bacteriol, 1997; 47 (2): 479-491.

22- TISON, F; TACQUET, A; DEVULDER, B. *Un test simple d'étude micobactéries: la transformation du citrate de fer ammoniacal.* Ann Inst Pasteur, 1964; 106: 797.

23- TORKKO, P; KATILA, M-L; KONTRO, M. *Gas-chromatographic lipid profiles in identification of currently known slowly growing environmental mycobacteria.* J Med Microbiol, 2003; 52: 315 -323.

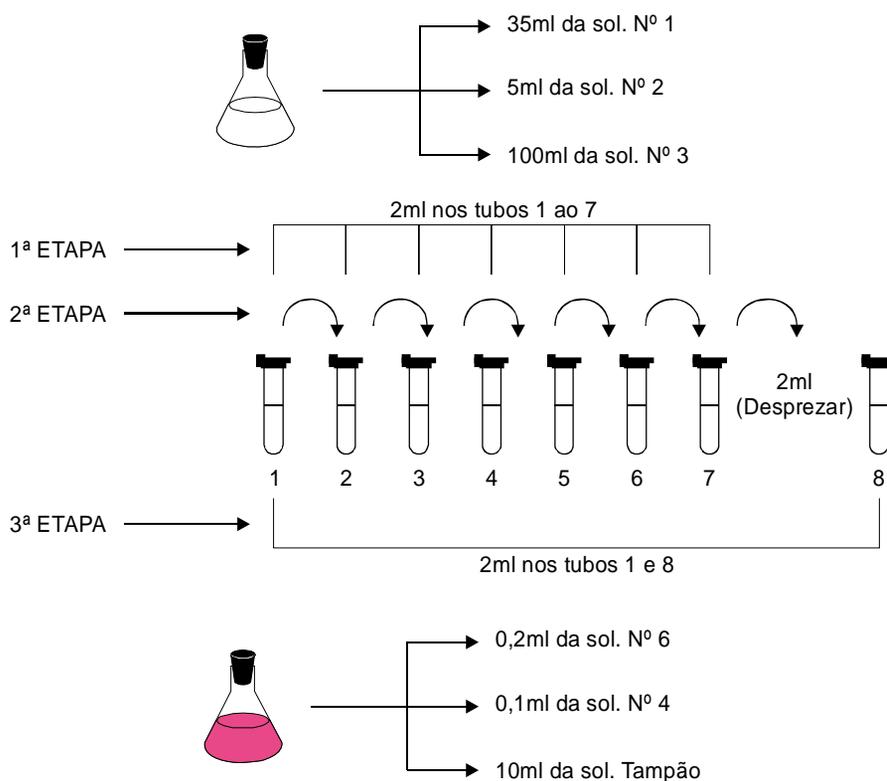
24- TSUKAMURA, M. *Identification of mycobacteria.* Obu: National Sanatorium Chubu Chest Hospital, 1975.

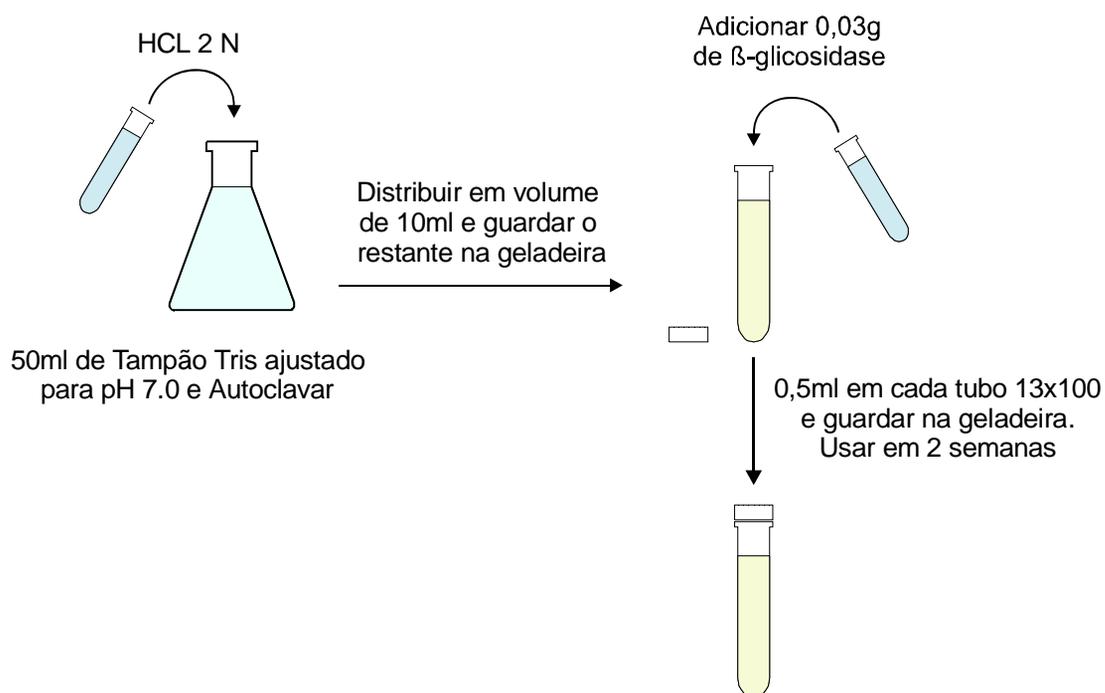
25- VIRTANEN, S. *A study of nitrate reduction by mycobacteria.* Acta Tuberc Scand 1960; 48 (supp. I): 1.

26- WAYNE, LG; DOUBEK, JR; RUSSEL, R L. *Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing TWEEN 80 as a substrate.* Amer Rev Respir Dis, 1964; 90: 588.

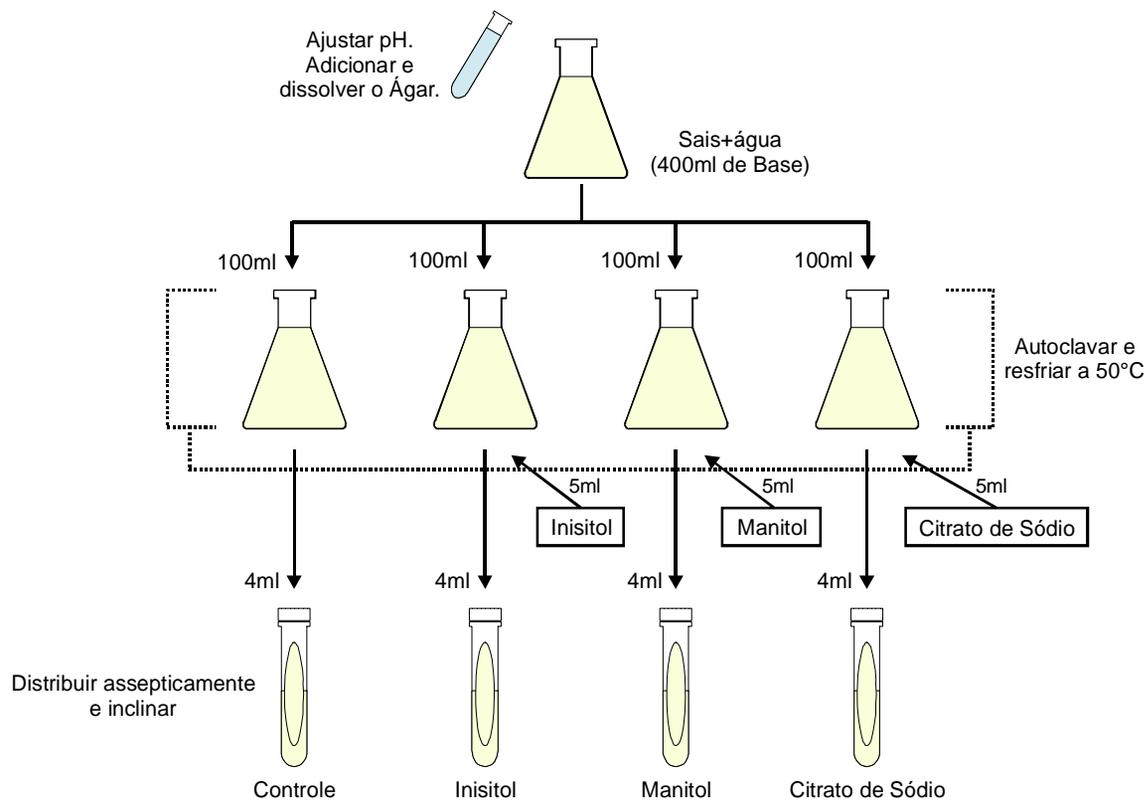
27- WAYNE, LG; KUBICA, G P. "Family Mycobacteriaceae Chester 1897". In: SNEATH, PHA; MAIR, NS [ET ALII]. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore: The Williams & Wilkins Co; 1986. VOL. 2, p. 1436.

ESQUEMA 1- PREPARAÇÃO DA ESCALA PADRÃO PARA A LEITURA DO NITRATO



ESQUEMA 2- PREPARAÇÃO DOS REATIVOS DA β -GLICOSIDASE

ESQUEMA 3- PREPARAÇÃO DO MEIO PARA UTILIZAÇÃO DOS AÇUCARES



FICHA 1- RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

TESTES		CULTURAS									
NIACINA											
NITRATO											
CATALASE AMBIENTE											
CATALASE 68C											
TWEEN											
BETA GLICOSIDASE											
URÉIA 1											
URÉIA 2											
GELOSE											
MacCONKEY											
C F A											
TEMPO DE CRESCIMENTO											
FOTOCROMO GENICIDADE											
COR											
TELURITO DE K											
ARIL SULFATASE											
LJ CONTROLE											
LJ NaCl 5%											
INOSITOL											
MANITOL											
CITRATO DE Na											
DATA											
_____ / _____ / _____											
RESPONSÁVEL											

FICHA 2- CONTROLE DOS REAGENTES PARA
CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AGENTES INIBIDORES

DATA DE PREPARAÇÃO	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	POTÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
INH				
RMP				
PZA				
SM				
EMB				
ETH				
PNB				
TCH				
OFLO 2				
CS				
HX				
Etileno Glicol				
Propileno glicol				

PESAGEM / VOLUME

DROGAS	QUANT.	H ₂ O DESTIL.	INCORPORAÇÃO		PARTIDA	DATA	
			DILUIÇÃO	VOLUME		PREPARO	VALIDADE
INH		*	1/100				
RMP							
PZA							
SM			1/10				
EMB			1/10				
ETH		*					
PNB		**					
TCH			1/10				
OFLO			1/10				
CS							
HX							

*ETILENO GLICOL

**PROPILENO GLICOL

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 6- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM NaCl

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
NaCl			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	PARTIDA	OBS
NaCl			
Meio Base LJ			

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 7- CONTROLE DE PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO
SUBSTRATO PARA A PROVA DA REDUÇÃO DO NITRATO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Nitrato de sódio			
KH_2PO_4			
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Nitrato de sódio	
KH_2PO_4	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	
H_2O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 8- CONTROLE DE PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
REVELADORES DA PROVA DA REDUÇÃO DO NITRATO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
HCl			
Sulfanilamida			
Hidrocloridrato de N- naftilenodiamina			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	PESAGEM	QUANTIDADE DE ÁGUA DESTILADA	REATIVO
HCl			1
Sulfanilamida			2
Hidrocloridrato de N- naftilenodiamina			3

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 9- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO AZUL DE BROMOTIMOL A 1%

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Azul de bromotimol			
Álcool Etílico Comercial 95°			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

<table border="1"> <thead> <tr> <th>SUBSTÂNCIA</th> <th>QUANTIDADE/VOLUME</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Azul de bromotimol</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Álcool Etílico Comercial 95°</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE/VOLUME	Azul de bromotimol		Álcool Etílico Comercial 95°	
SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE/VOLUME						
Azul de bromotimol							
Álcool Etílico Comercial 95°							

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 10- CONTROLE DE PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
PARA LEITURA DA PROVA DA REDUÇÃO DO NITRATO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)			
Fosfato monopotássico (K ₂ HPO ₄)			
Fosfato trissódico (Na ₃ PO ₄)			
Álcool etílico comercial a 95°			
Fenolftaleína			
Azul de bromotimol			
H ₂ O destilada			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	PESAR*	DILUIR*	VALIDADE	REAGENTE Nº
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄) M/15	0,954 g	H ₂ O qsp		1
Fosfato monopotássico (K ₂ HPO ₄) M/15	0,92 g	H ₂ O qsp		2
Fosfato trissódico (Na ₃ PO ₄) M/15	1,1 g	H ₂ O qsp		3
Fenolftaleína a 1%	1g	Álcool etílico		4
Azul de bromotimol a 1%	Ver preparação na ficha 9			5
Azul de bromotimol a 0,1%	1 ml do reagente	H ₂ O qsp		6

* PARA PREPARAR 100 ml

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 11- CONTROLE DA PREPARAÇÃO
DO TWEEN 80 PARA A PROVA DA CATALASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
TWEEN 80			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
TWEEN 80	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 12- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA A PROVA DA CATALASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE

TWEEN 80			
----------	--	--	--

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

<table border="1"> <tr> <th>SUBSTÂNCIA</th> <th>QUANTIDADE</th> </tr> <tr> <td>TWEEN 80</td> <td></td> </tr> <tr> <td>H₂O destilada</td> <td></td> </tr> </table>		SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	TWEEN 80		H ₂ O destilada	
SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE						
TWEEN 80							
H ₂ O destilada							

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--

RESPONSÁVEL

--

FICHA 13- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA A PROVA DA BETA-GLICOSIDASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo			
TRIS(Hidroximetilaminometano)			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo	
TRIS(Hidroximetilaminometano)	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 14- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO
TAMPÃO PARA A PROVA DA BETA-GLICOSIDASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
TRIS(Hidroximetilaminometano)			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
TRIS(Hidroximetilaminometano)	0,6057 g
H ₂ O destilada	100 ml

pH do tampão TRIS

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 15- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DO VERMELHO NEUTRO A 0,1%

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Vermelho neutro			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Vermelho neutro	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 16- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO
 PARA A PROVA DA HIDRÓLISE DO TWEEN 80

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
TWEEN 80			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
TWEEN 80	
Solução de vermelho neutro a 1%	
tampão fosfato	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 17- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO
LOWENSTEIN JENSEN COM CITRATO FÉRRICO AMONICAL

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Citrato férrico amoniacal			

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	PARTIDA	OBS
Citrato férrico amoniacal			
Meio base LJ			

PESAGEM / VOLUME

CONTROLE DE QUALIDADE			
APROVADO ()		REPROVADO ()	

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 18- CONTROLE PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A PROVA DA UTILIZAÇÃO DE AÇUCARES

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Sulfato de Amônio			
MgSO ₄ .7H ₂ O			
KH ₂ PO ₄			
Agar			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Sulfato de Amônio	
MgSO ₄ .7H ₂ O	
KH ₂ PO ₄	
Agar	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 19- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DOS AÇÚCARES

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Inositol			
Manitol			
Citrato de Sódio			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	ÁGUA DESTILADA
Inositol		
Manitol		
Citrato de Sódio		

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 21- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO REAGENTE
PARA A PROVA DA REDUÇÃO DO TELURITO DE POTÁSSIO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Telurito de Potássio			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Telurito de Potássio	
Água destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 22- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO
SUBSTRATO PARA A PROVA ARILSULFATASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Dissulfato de Fenolftaleína sal Tripotássico			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Dissulfato de Fenolftaleína sal Tripotássico	
Água	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 23- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO CARBONATO DE SÓDIO PARA A PROVA DA ARIL SULFATASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Carbonato de sódio			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Carbonato de sódio	
água destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 24- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM SUBSTRATO DA PROVA ARILSULFATASE

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

PESAGEM / VOLUME			

SUBSTÂNCIA	Nº DE PARTIDA	VALIDADE	QUANTIDADE INCORPORADA
Dissulfato Tripotássico de Fenolftaleína (solução)			
Meio 7H9			

--	--	--	--

CONTROLE DE QUALIDADE	
APROVADO ()	REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL



Capítulo 6

*TESTE DE SENSIBILIDADE DE M. TUBERCULOSIS
AOS ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS*

6.1- INTRODUÇÃO

A resistência a drogas em *M. tuberculosis* surge por mutação espontânea, pois ocorre independentemente do contato prévio do bacilo com as drogas. Em toda população de células sensíveis existe uma pequena proporção de mutantes resistentes, de cerca de 1 por 10^8 células, por geração.

Quando uma única droga é utilizada no tratamento da tuberculose, a maioria dos bacilos é inibida ou morta. Mas, como o tratamento é longo, pois a população bacteriana é elevada, as células mutantes resistentes vão-se multiplicando até se tornarem a maioria.

Portanto, a resistência a drogas em tuberculose é o resultado da inter-relação do fenômeno da mutação espontânea e da seleção de população predominantemente resistente como consequência de tratamento irregular e/ou inadequado. Este processo seletivo é conhecido como resistência “adquirida”. Para fins epidemiológicos, quando o paciente que desenvolve resistência infecta um outra pessoa, e esta adoece, diz-se que o novo caso apresenta resistência primária.

O conhecimento das taxas de resistência permite avaliar a qualidade dos programas de controle da tuberculose de um país e possibilita a modificação de esquemas terapêuticos vigentes.

6.2- INDICAÇÃO

A realização do teste de sensibilidade está indicada nos casos de:

- pacientes com suspeita de resistência, por abandono, por falência de tratamento, por recidiva ou por ser contato de um caso de tuberculose resistente;
- na vigilância epidemiológica da resistência.

6.3- METODOLOGIA

A sensibilidade de *M. tuberculosis* às drogas pode ser avaliada pelo método das concentrações absolutas, método da relação de resistência e pelo método das proporções. Esses são os métodos bacteriológicos mais empregados e aceitos pela Organização Mundial de Saúde.

6.4- MÉTODO DAS PROPORÇÕES

6.4.1- PRINCÍPIO

Este método foi descrito por Canetti, Rist & Grosset em 1963 e consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis mas não o das células resistentes - “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em um população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente - “proporção crítica”.

6.4.2- PREPARAÇÃO DO MEIO COM DROGAS

O meio mais utilizado é o de Lowenstein Jensen, sendo as drogas incorporadas ao mesmo, antes da coagulação. Anotar na ficha 1 “Controle de Produção de Meio de Cultura Para Teste de Sensibilidade às Drogas” a preparação de cada partida (ver anexo). As concentrações empregadas, com suas respectivas proporções críticas, assim como a preparação das soluções para incorporação no meio de LJ estão, respectivamente, apresentadas nas tabelas 1 e 2. Cada vez que pesar as drogas anotar na ficha 2 “Controle da Pesagem dos Reagentes Para Teste de Sensibilidade às Drogas”. Ver anexo esquema 1 “Preparação do Meio com Drogas”.

6.4.2.1- Meio com Pirazinamida

Esta droga é testada em meio previamente acidificado entre pH 5,0 e 5,2, utilizando-se HCl 2 N (Ver preparação no Capítulo 10 SOLUÇÕES E REAGENTES. MATERIAL DO LABORATÓRIO). A partir da base do meio LJ, tomar uma alíquota conhecida, do meio de cultura (cerca de 30ml), adicionar o ácido até obter o pH desejado, anotando o volume utilizado para a acidificação. Fazer o cálculo para incorporação no volume restante do meio. Após este ajuste, retirar uma outra alíquota em um becher, medir o pH e submeter a coagulação juntamente com os tubos. Depois de coagulado, o pH do meio não deve ultrapassar 5,4.

Tabela 1- Concentração crítica das drogas empregadas no teste de sensibilidade de *M.tuberculosis* e na identificação de micobactérias e a proporção crítica de mutantes resistentes

DROGAS	CONCENTRAÇÕES (µg/ml)	PROPORÇÕES (%)
Isoniazida (INH)	0,2	1,0
Rifampicina (RMP)	40,0	1,0
Pirazinamida (PZA)	100,0	10,0
Estreptomicina (SM)	4,0	10,0
Etambutol (EMB)	2,0	1,0
Etionamida (ETH)	20,0	10,0
Ácido p-nitrobenzóico (PNB)*	500,0	1,0
Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH)*	2,0	1,0
Cicloserina (CS)*	30,0	1,0
Ofloxacin (OFLO2)*	2,0	1,0
Hidroxilamina (HX)*	500,0	1,0

*Drogas utilizadas na identificação de micobactérias

Tabela 2- Preparação das soluções e as diluições das drogas para incorporação no meio de Lowenstein Jensen

DROGA	POTÊNCIA (%)	PESAGEM (g)	DILUENTE (10ml)	DILUIÇÕES	PARA 200ml de L-J
INH	100	0,1	água destilada	1/100	0,4
RMP	100	0,1	etileno glicol	-	0,8
PZA	100	0,1	água destilada	-	2,0
SM (*)	50	0,2	água destilada	1/10	0,8
EMB	100	0,1	água destilada	1/10	0,4
ETH (*)	100	0,16	etileno glicol	-	0,4
PNB	100	0,2	propileno glicol	-	5,0
TCH	100	0,1	água destilada	1/10	0,4
CS	100	0,1	água destilada	-	0,6
OFLO	100	0,1	água destilada	-	0,4
HX	100	0,2	água destilada	-	5,0

*A pesagem dessas drogas deve ser recalculada se a potência referida pelo fabricante for diferente da apresentada na tabela acima.

6.4.3- TÉCNICA

O teste de sensibilidade pode ser realizado a partir de escarro positivo a baciloscopia (teste direto) ou a partir da cultura (teste indireto).

6.4.3.1- Preparação da Suspensão Bacilar, Diluição e Semeadura

6.4.3.1.1- Teste Indireto

A partir de um crescimento em meio sólido, isento de droga, fazer uma suspensão, utilizando o maior número de colônias possível, em um tubo 20 x 150mm contendo cerca 10 pérolas de vidro e aproximadamente 0,5ml de água destilada estéril. Agitar em vórtex por 20 a 30 segundos para homogeneizar a suspensão. Adicionar 0,5ml de água destilada estéril, agitar o tubo e manter em repouso por 5 minutos. Gotejar lentamente a suspensão em tubo contendo 3ml de água destilada estéril até obter a turvação correspondente ao tubo nº 1 da escala de MacFarland (Ver preparação no Capítulo 10) ou de uma suspensão padrão de BCG de 1mg/ml. A partir dessa suspensão padronizada, efetuar diluições decimais até 10^{-6} e semear 0,1 ml das diluições 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} nos tubos controle (sem droga). Nos tubos com as drogas somente as diluições 10^{-3} e 10^{-5} . Tubos contendo meio LJ adicionado de PNB e de TCH são utilizados se como agentes inibidores de crescimento, concomitantemente, para auxiliar no diagnóstico da espécie que está sendo testada. Ver anexo esquema 2 “Preparação de Inóculo e Semeadura do Teste Indireto”.

6.4.3.1.2- Teste Direto

O teste direto é aquele realizado a partir do escarro, que seja positivo a baciloscopia, para abreviar o tempo do diagnóstico do teste de sensibilidade. Para preparação do inóculo deve-se proceder à descontaminação rotineira, como descrita no Capítulo 4 CULTURA, por qualquer um dos métodos, levando em consideração que é necessário um certo volume de escarro, pelo menos 10ml, para haver material suficiente para semear os diversos tubos com drogas. Após a concentração do material, fazer diluições decimais seriadas até 10^{-4} e semear 0,1ml desta suspensão nos tubos controle e nos tubos com drogas, conforme o número de cruces encontradas previamente na baciloscopia deste material.

Ver anexo esquemas 3, 4 e 5 “Preparação de Inóculo e Semeadura do Teste Direto +, ++ e +++”.

RESULTADO DA BACILOSCOPIA	DILUIÇÕES SEMEADAS
+	sem diluição, 10^2
++	10^{-1} , 10^{-3}
+++	10^{-2} , 10^{-4}

6.4.3.2- Incubação

Após a semeadura, colocar os tubos inclinados horizontalmente em uma bandeja de forma que o inóculo se distribua sobre toda a superfície do meio, mantendo-os com a tampa frouxa por 24-48 horas para secar o inóculo. Após este período os tubos podem ser incubados na posição vertical em estufa $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 dias. Anotar os resultados do teste se houver crescimento eugênico nos tubos-controle. Caso não haja crescimento ainda nos tubos-controle de PZA, reincubá-los e fazer nova leitura com 28 dias para finalizar o teste com esta droga.

6.4.3.3- Leitura e Interpretação

Após a leitura do teste, realizar o cálculo da porcentagem de bacilos resistentes da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Número de Colônias no Tubo com Drogas} \times 100}{\text{Número de Colônias no Tubo Controle}} = \% \text{ de Bacilos Resistentes}$$

Quando esta porcentagem for superior ou igual à proporção crítica estabelecida para cada droga, a amostra é considerada resistente.

A seguir serão mostrados dois exemplos para melhor ilustrar a interpretação dos resultados.

Exemplo 1:

DILUIÇÃO	CONTROLE	INH	SM
10 ⁻⁵	200 colônias	4 colônias	10 colônias

Cálculo:

$$\text{INH} > \frac{4 \times 100}{200} = 5 \% \text{ de Bacilos Resistentes à SM}$$

$$\text{SM} > \frac{10 \times 100}{200} = 5 \% \text{ de Bacilos Resistentes à INH}$$

Neste caso, a amostra é resistente à INH e sensível à SM, pois a proporção de bacilos resistentes é respectivamente maior e menor do que a proporção crítica dessas drogas (1 e 10%).

Exemplo 2:

DILUIÇÃO	CONTROLE	EMB	RMP
10 ⁻³	crescimento confluyente	20 colônias	5 colônias
10 ⁻⁵	100 colônias	-	-

Como o tubo-controle semeado com a diluição 10⁻³ forneceu número incontável de colônias, contam-se as colônias que cresceram no tubo-controle com maior diluição (10⁻⁵) e multiplica-se por 100 para se obter o número de colônias no controle correspondente à diluição 10⁻³ (100 colônias no tubo-controle 10⁻⁵ é igual a 10.000 colônias no 10⁻³).

Cálculo:

$$\text{EMB} > \frac{20 \times 100}{10.000} = 0,2 \% \text{ de Bacilos Resistentes ao EMB}$$

$$\text{RMP} > \frac{5 \times 100}{10.000} = 0,05 \% \text{ de Bacilos Resistentes à RMP}$$

Neste caso a amostra é sensível ao EMB e à RMP, pois a proporção de bacilos resistentes observada é inferior à proporção crítica estabelecida para as mesmas (1%).

6.4.3.4- Controle de Qualidade

Cada partida de meio com droga preparada deverá ser sempre avaliada semeando-se *M.tuberculosis* (H₃₇Rv ou H₃₇Ra) em todos os tubos, ou seja, o mesmo procedimento do teste. Estas estirpes mostram-se sensíveis às drogas utilizadas nos esquemas de tratamento.

Nesse caso haverá o crescimento nos tubos-controle (sem droga) de colônias na ordem de incontáveis (crescimento confluyente) no tubo 10^{-3} ; e o crescimento de colônias contáveis entre 50 a 150 no tubo 10^{-5} . Nos demais tubos com drogas, ausência de crescimento. Adicionalmente, outras amostras-tipo podem ser utilizadas, para avaliar determinadas drogas, como é o caso de *M. fortuitum*, que é sensível à etionamida e resistente às demais e *M. bovis* BCG, que é resistente à pirazinamida. Anotar na ficha 3 “Controle dos Resultados de Leitura do Teste de Sensibilidade”.

A leitura do teste de sensibilidade não deve ultrapassar a 20 dias, pois falsa resistência a estas drogas pode ser observada (etionamida, estreptomicina, etambutol), e porque se degradam pelo calor da incubação prolongada.

Todas as etapas da preparação do meio com droga, como: pesagem, diluição, volume de incorporação da droga no meio, data da preparação, devem ser anotadas em fichas próprias já referidas anteriormente.

O meio com drogas, após a coagulação e controle de esterilidade, deve ser guardado em geladeira a 4°C aproximadamente, por no máximo 1 mês.

6.5- BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos assépticos deverão ser efetuados em uma área de biossegurança nível 3 em cabines de segurança biológica classe II B2/B3, usando luvas, avental, óculos e respirador.

Na preparação do meio de cultura usar a cabine de fluxo laminar horizontal.

Quando for pesar drogas e preparar os reagentes, utilizar EPIs adequados a cada um. Consultar o Capítulo BIOSSEGURANÇA ao planejar e executar o trabalho. Os rejeitos líquidos produzidos podem ser colocados na pia sob fluxo de água corrente ou de acordo com o plano de rejeitos do LACEN.

6.6- MATERIAL UTILIZADO

- amostras-tipo H37Ra, H37Rv, *M. fortuitum*, *M. bovis*;
- autoclave;
- ácido clorídrico;
- ácido p-nitrobenzóico;
- agitador de tubos (vórtex);
- água destilada;
- avental;
- balança;
- balão com pérolas de vidro;
- balão;
- batedeira;
- becher;
- cabine de exaustão de gases;
- cabine de fluxo laminar horizontal;

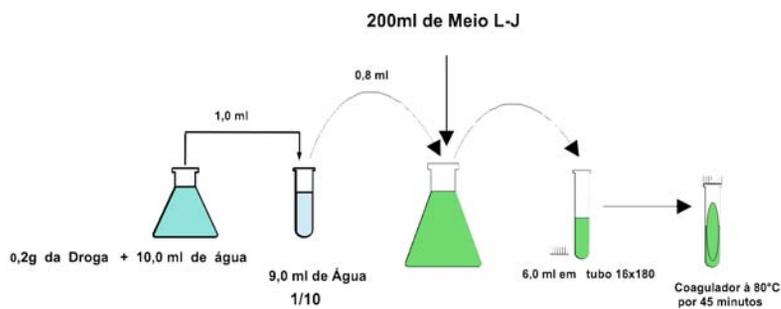
- cabine de segurança biológica classe II B2 ou B3;
- calculadora;
- caneta hidrográfica;
- carrinho de aço;
- cicloserina;
- coagulador;
- despertador de bancada;
- destilador;
- erlenmeyer;
- estantes de madeira;
- estreptomina;
- estufa bacteriológica;
- etambutol;
- etileno glicol;
- etionamida;
- frasco de reagentes;
- funil de aço;
- gaze;
- geladeira;
- glicerol;
- hidrazida do ácido tiofenocarboxílico;
- hidroxilamina;
- isoniazida;
- luva;
- máscara;
- meio de Lowenstein Jensen em pó;
- ofloxacina;
- ovos;
- pipetador automático;
- pipetas de vidro;
- pirazinamida;
- potenciômetro;
- propileno glicol;
- proveta;
- recipiente de aço para descarte de material contaminado;
- rifampicina;
- tubo nº1 da escala de McFarland;
- tubos 13x100mm;
- tubos 20x150mm.

6.7- BIBLIOGRAFIA

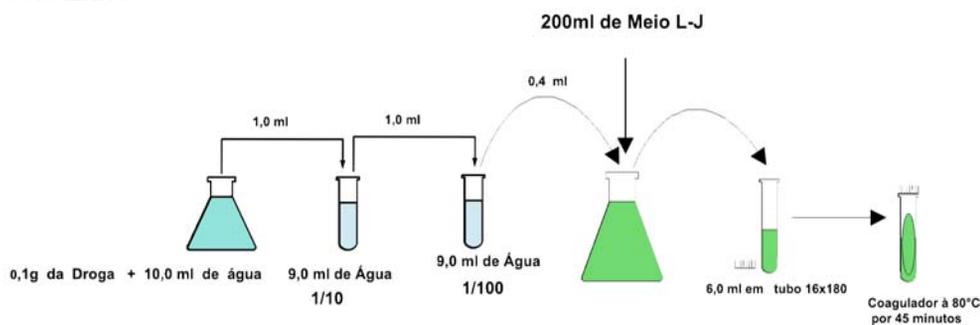
- 1- BARRETO, AMW & MARTINS, FM. *Estudo da resistência primária no Brasil no período de 1986 a 1988*. Bol. CNCT 1988:2.
- 2- BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI/CRPHF. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 1994. 2 ed. revisada e ampliada.
- 3- CANETTI, G; FOX, W; KHOMENKO, A [ET ALII]. *Advances in techniques of testing mycobacterial drugs sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes*. Bull World Health Organ, 1969; 41: 31- 43.
- 4- DAVID, HL. *Fundamentals of drug susceptibility testing in Tuberculosis*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1971.
- 5- DAVID, HL; LÉVY-FRÉBAULT, V & Thorel, MF. *Méthods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Paris: Institute Pasteur; 1989.
- 6- KENT, PT & KUBICA, GP. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
- 7- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD/Organizacion Mundial de la Salud/Centro Panamericano de Zoonosis. “La muestra. El Examen Microscopico” (Parte I). IN: *Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriologia de la Tuberculosis*. Nota Técnica nº 26/ Rev.1, Martinez: CEPANZO;1986.

ESQUEMA 1- PREPARAÇÃO DO MEIO COM DROGAS

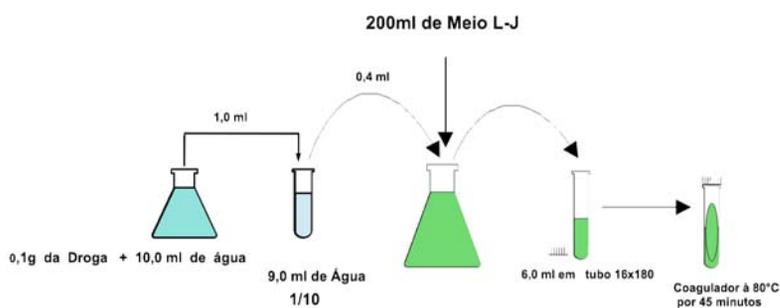
1) ESTREPTOMICINA



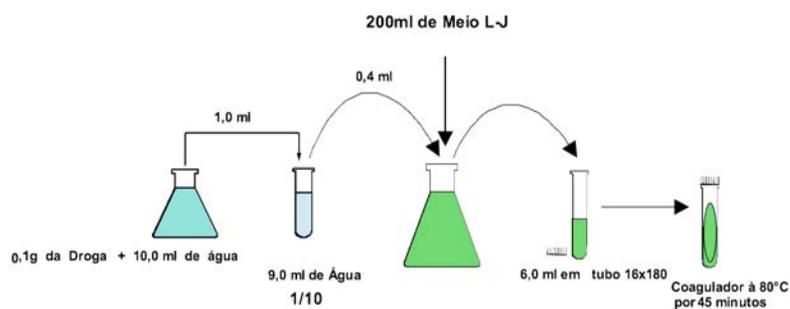
2) ISONIAZIDA



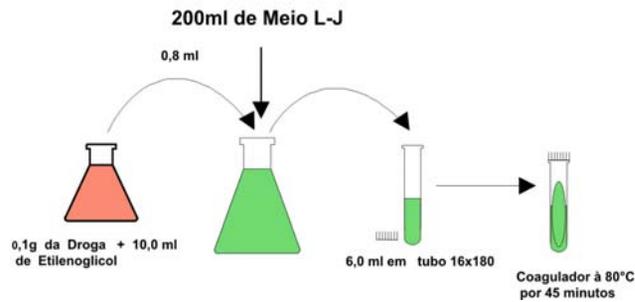
3) ETAMBUTOL



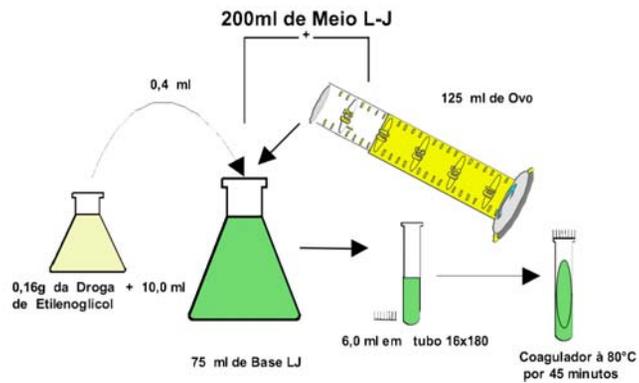
4) TCH



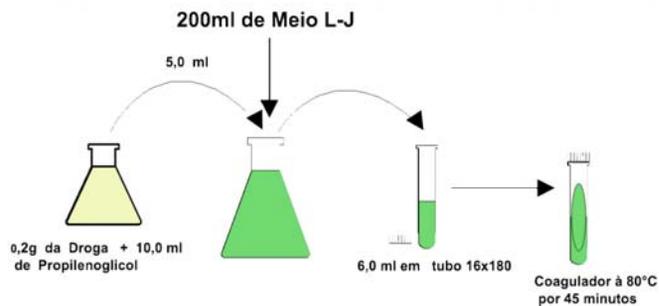
5) RIFAMPICINA



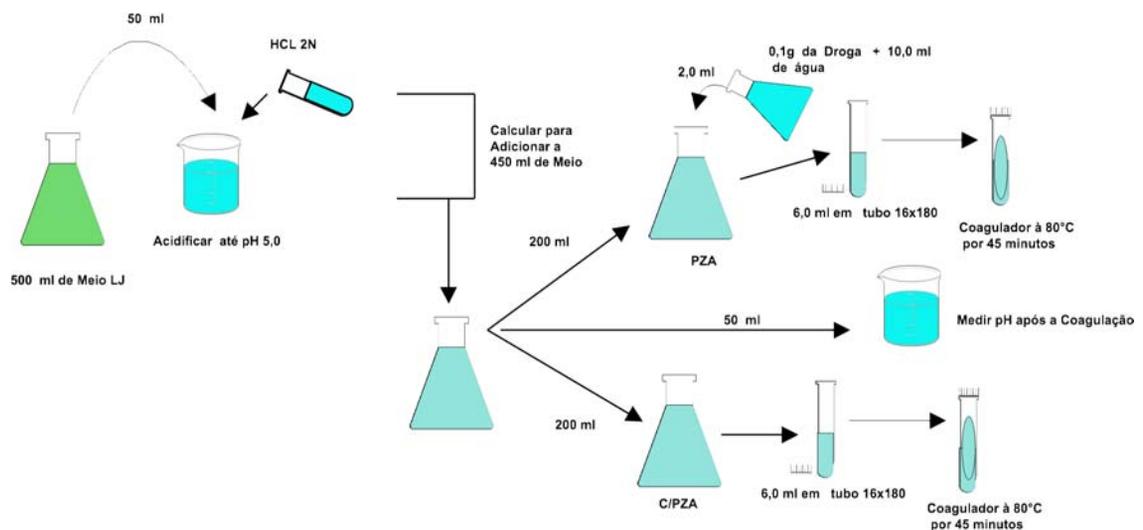
6) ETIONAMIDA



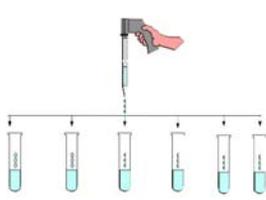
7) PNB



8) PIRAZINAMIDA



ESQUEMA 2- PREPARAÇÃO DE INÓCULO E SEMEADURA DO TESTE INDIRETO



1) Distribuição de 9ml de Água destilada estéril



2) Pérola com 0,5ml de Água destilada estéril



3) Pescar o maior número de colônias possível



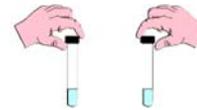
4) Colocar no tubo com pérolas



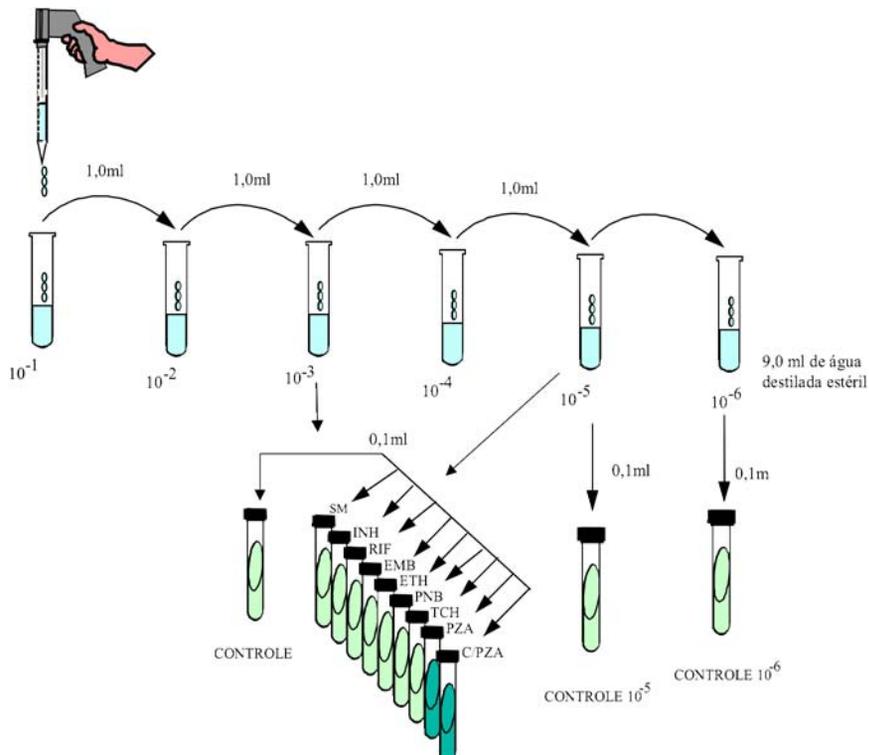
5) Agitar em Vórtex e repousar por 5 minutos



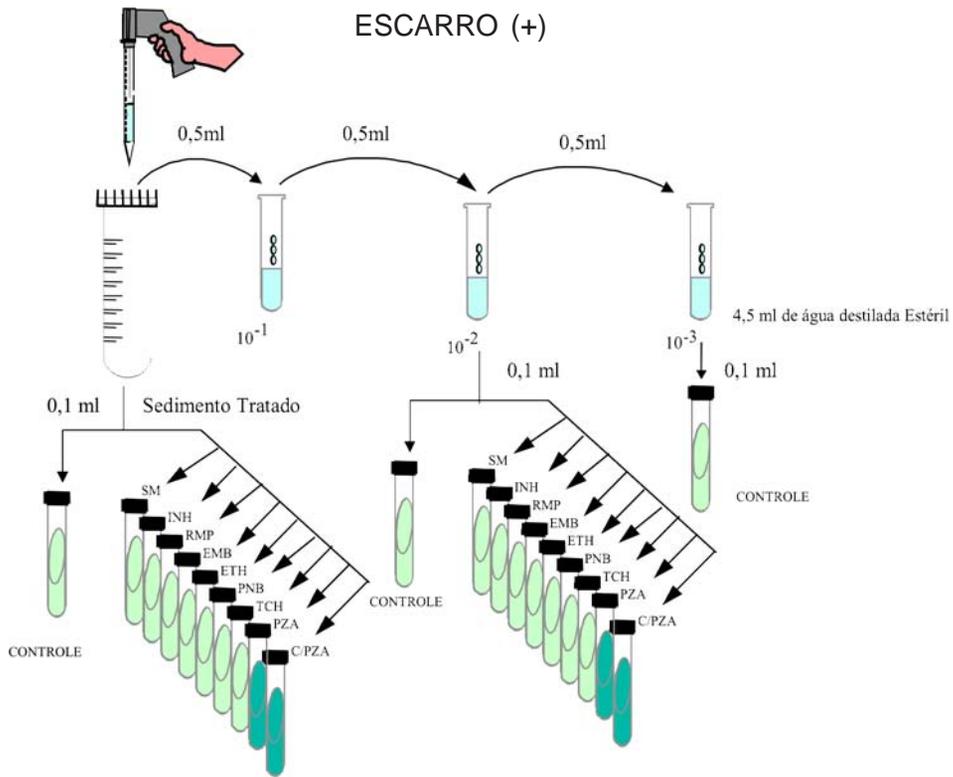
6) Gotear a suspensão em um tubo contendo 3ml de Água destilada estéril até obter uma turvação correspondente ao tubo nº 1 da escala de Mac Farland



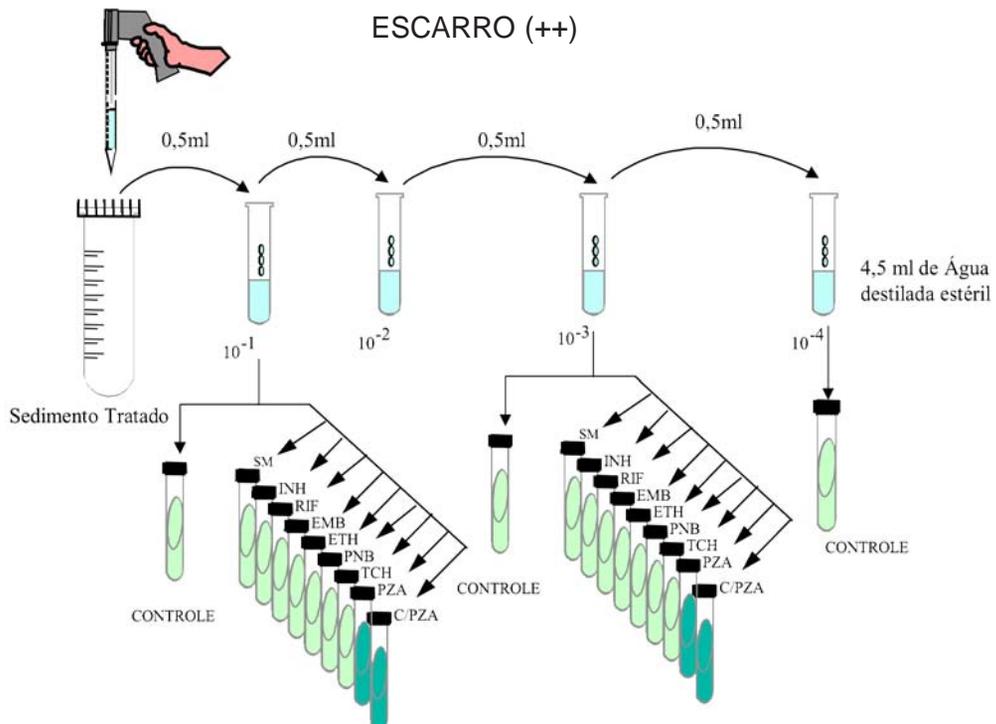
7) Efetuar diluições sucessivas até 10^{-6} e semear 0,1 ml nos tubos.



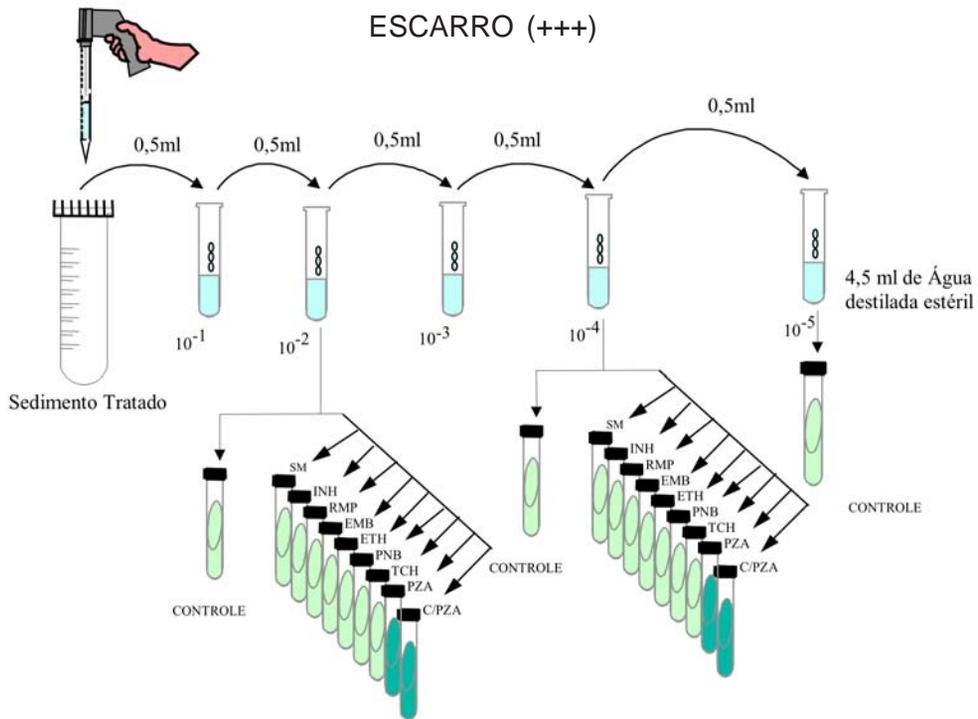
ESQUEMA 3- PREPARAÇÃO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE DIRETO



ESQUEMA 4- PREPARAÇÃO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE



ESQUEMA 5- PREPARAÇÃO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE DIRETO



FICHA 2- CONTROLE DOS REAGENTES PARA
CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AGENTES

DATA DE PREPARAÇÃO	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	POTÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
INH				
RMP				
PZA				
SM				
EMB				
ETH				
PNB				
TCH				
OFLO 2				
CS				
HX				
Etileno Glicol				
Propileno glicol				

PESAGEM / VOLUME

DROGAS	QUANT.	H ₂ O DESTIL.	INCORPORAÇÃO		PARTIDA	DATA	
			DILUIÇÃO	VOLUME		PREPARO	VALIDADE
INH		*	1/100				
RMP							
PZA							
SM			1/10				
EMB			1/10				
ETH		*					
PNB		**					
TCH			1/10				
OFLO			1/10				
CS							
HX							

*ETILENO GLICOL

**PROPILENO GLICOL

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 3- CONTROLE DOS RESULTADOS DE LEITURA DO TESTE DE SENSIBILIDADE/AGENTES INIBIDORES

NÚMERO		ANO													
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA										LOTE			
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		PZA	INH	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH	OFLO	CS	HX	
		LJ	LJ/PZA												
10 ³	20														
10 ⁵	20														
10 ⁶	20														
Percentagem															
Diagnóstico															
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR													

AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA										LOTE		
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		PZA	INH	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH	OFLO	CS	HX
		LJ	LJ/PZA											
10 ³	20													
10 ⁵	20													
10 ⁶	20													
Percentagem														
Diagnóstico														
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR												

AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA										LOTE		
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		PZA	INH	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH	OFLO	CS	HX
		LJ	LJ/PZA											
10 ³	20													
10 ⁵	20													
10 ⁶	20													
Percentagem														
Diagnóstico														
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR												



Capítulo 7

*MÉTODO AUTOMATIZADO (MB/BacT) PARA O
TESTE DE SENSIBILIDADE*

7.1- INTRODUÇÃO

O laboratório de tuberculose foi um dos últimos a incorporar técnicas automatizadas na sua rotina. Somente no final dos anos 70 os trabalhos de Cummings *et al*, Middlebrook *et al*. e Kertcher *et al*. culminaram com a introdução de um sistema rápido e semi-automatizado para o diagnóstico da tuberculose. Este sistema, desenvolvido pela Becton Dickinson, baseado na detecção de ^{14}C - ácido palmítico começou a ser utilizado a partir dos anos 80, para o isolamento de micobactérias de material humano, mostrando grande acurácia quando comparado a métodos tradicionais. O desenvolvimento de sistemas de lise de células sanguíneas consagrou este sistema no isolamento de micobactérias de pacientes HIV positivos. Além do isolamento, este sistema permitiu separar o “Complexo” *M. tuberculosis* das demais espécies, além de se tornar padrão-ouro em antibiograma nos países desenvolvidos, nestes últimos 20 anos.

Atualmente o BACTEC está sendo substituído pelo MGIT, na sua versão totalmente automatizada, pois além disso oferece a vantagem de não produzir resíduo radioativo.

Todos esses sistemas permitem a introdução de outros antibióticos/substâncias inibidoras, para identificação, sondas genéticas, cromatografia líquida e outros métodos para o diagnóstico final.

Todos os sistemas desenvolvidos até o presente utilizam o meio 7H9 de Middlebrook como meio de cultura principal, variando no modo de detecção e nos suplementos para prevenir a contaminação.

Mas o primeiro sistema totalmente automatizado foi o desenvolvido pela Organon Teknika e foi o que escolhemos para trabalhar atualmente no nosso laboratório. Para isso estudamos sua utilização no antibiograma direto e indireto comparando com o BACTEC e LJ, com resultados bem acurados.

7.2- PRÍNCÍPIO E INDICAÇÃO

O MB/BacT utiliza como princípio um sensor colorimétrico e luz refletida para monitorar a presença e produção de dióxido de carbono (CO_2) que está dissolvido no meio de cultura. Se houver microorganismos na amostra testada, será produzido CO_2 como resultado do metabolismo dos substratos do meio de cultura. A cor do sensor gás-permeável localizado no fundo de cada frasco será alterada pela presença de CO_2 , passando de verde escuro para verde claro ou amarelo. A coloração mais clara resulta em um aumento de unidades de reflectância monitoradas e registradas pelo equipamento a cada 10 minutos. A reflectância do frasco é, no momento da detecção, comparado a 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) por ml. Este sistema, além de fornecer resultados mais rápidos de crescimento, com grande acurácia para *M.tuberculosis*, permite também a utilização de frascos para detecção no sangue (MB BLOOD BOTTLE), sendo indicado principalmente para instituições que recebem material clínico de pacientes com AIDS.

7.3- TESTE DIRETO

O teste direto é feito a partir de escarro positivo a baciloscopia, para abreviar o diagnóstico final da sensibilidade às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. Na nossa experiência, em 20 dias, conseguimos diagnosticar 80% dos testes. A quantidade de material e o método de descontaminação podem ser fatores críticos para a não realização do teste.

7.3.1- TÉCNICA

- fixar na planilha (que correlaciona o código de barras do frasco a ser utilizado, a droga ou os controles a serem testados, e o resultado e tempo de determinação de positividade a ser registrado), a etiqueta de código de barras descartável que acompanha o frasco de processamento. Ver ficha 3 “Resultados do Teste no MB/BacT”;
- ressuspender o sedimento do material tratado (utilizando o método de Corper & Stoner modificado, conforme Capítulo 4 “CULTURA” em 1,0 ml de água destilada estéril);
- adicionar 0,5ml do suplemento de antibiótico (conforme recomendação do fabricante) em dez (10) frascos de processamento MB/BacT;
- as drogas a serem testadas devem ser preparadas, conforme a seqüência descrita no esquema 1 “Preparação do Inóculo e Semeadura do Teste Direto” anexo, e adicionadas no volume de 0,1ml em seus respectivos frascos previamente identificados, exceto nos frascos “Controle”. “Controle 1/100” e “Controle PZA”. Anotar na ficha1 “Controle da Preparação de Reagentes Para Teste de Sensibilidade”;
- nos frascos que contêm a droga PZA e o “Controle PZA” adicionar 0,5ml da solução de ácido clorídrico 0,2 N, de modo a obter um pH final de 5,7. Anotar na ficha 2 “Controle da Preparação da Solução Acidificadora Para Teste do PZA no MB/BacT”;
- inocular 0,5ml do material nos frascos “Controle” e nos frascos contendo as respectivas drogas a serem testadas, exceto no frasco “Controle 1/100”;
- no frasco “Controle 1/100” inocular 0,5ml da diluição em água, na proporção 1/100 do material;
- colocar todos os frascos no equipamento, seguindo as recomendações contidas no Manual de Operações do Equipamento.

7.4- TESTE INDIRETO

7.4.1- TÉCNICA

- fixar em uma planilha (que correlacione o código de barras do frasco a ser utilizado, droga ou os controles a serem testados, e o resultado e tempo de determinação de positividade a ser registrado), a etiqueta de código de barras descartável que acompanha o frasco de processamento. Ver ficha 3 “Resultados do Teste no MB/BacT”;
- colocar em um tubo de 13x100mm contendo cerca de 10 pérolas de vidro uma alçada de colônias obtidas a partir de um crescimento em meio sólido (cultura);
- agitar em vórtex por 20 a 30 segundos e manter em repouso por 5 minutos;
- adicionar 0,5ml de água estéril, agitar em vórtex para homogeneizar e manter em repouso por 5 minutos;
- gotejar lentamente a suspensão obtida, em um tubo contendo cerca de 2ml de água estéril até obter turvação correspondente ao tubo nº 1 da escala de McFarland. Ver capítulo 10 “MATERIAL DO LABORATÓRIO. SOLUÇÕES E REAGENTES”;
- a partir da suspensão padronizada, efetuar uma diluição de 1/10 e 1/100 em água destilada estéril;

- adicionar 0,5ml do suplemento de antibiótico (conforme recomendação do fabricante) em dez (10) frascos de processamento MB/BacT;
- as drogas a serem testadas devem ser preparadas, conforme a seqüência descrita no esquema 2 “Preparação do Inóculo e Semeadura do Teste Indireto” anexo, e adicionadas no volume de 0,1ml em seus respectivos frascos previamente identificados, exceto nos frascos, “Controle 1/100” e “Controle PZA” Anotar na ficha 1 “Controle da Preparação de Reagentes Para Teste de Sensibilidade às Drogas”;
- nos frascos que contêm a droga PZA e o “Controle PZA” adicionar 0,5ml da solução de ácido clorídrico 0,2 N, de modo a obter um pH final de 5,7. Anotar na ficha 2 “Controle da Preparação da Solução Acidificadora Para Teste do PZA (MB/BacT)”;
- inocular 0,1ml do material nos frascos contendo as respectivas drogas a serem testadas, exceto no frasco “Controle 1/100”;
- no frasco “Controle 1/100” inocular 0,5 ml da diluição em água, na proporção 1/100 do material ressuspensão;
- colocar todos os frascos no equipamento, seguindo as recomendações contidas no Manual de Operações do Equipamento.

7.5- CONCENTRAÇÃO DAS DROGAS (3)

No laboratório de referência, trabalhamos rotineiramente com PNB incorporado ao meio de cultura do MB/Bact para confirmar a identificação de *M. tuberculosis*, juntamente com os testes de sensibilidade na concentração de 500 µg/ml. Mas esta concentração está indicada para incorporação em meio a base de ovo e no MB/BacT. Experiências preliminares realizadas por nós apontam para uma concentração inibitória mínima entre 250 e 125 µg/ml, ainda sob investigação.

A preparação das drogas está nos esquemas 3 e 4 anexos e as concentrações empregadas nos testes, tanto o direto quanto o indireto, estão apresentadas nas tabelas abaixo:

Tabela 1- Concentração crítica das drogas empregadas no teste de sensibilidade

DROGAS	CONCENTRAÇÕES (µg/ml)
Isoniazida (INH)	0,1
Rifampicina (RMP)	2,0
Pirazinamida (PZA)	100
Estreptomina (SM)	2,0
Etambutol (EMB)	2,5
Etionamida (ETH)	1,25
Ácido p-nitrobenzóico (PNB)*	500,0
Levofloxacin (Lev)Ofloxacin (OFLO)*	2,0
Amicacina (AMI)	2,0

*droga utilizada na identificação do “Complexo” *M. tuberculosis*

Tabela 2- Preparação das Soluções e as Diluições das Drogas

DROGA	POTÊNCIA (%)	PESAGEM (g)	DILUENTE (10ml)	DILUIÇÕES	PARA 10ml DE MEIO DO M/Bac
INH	99	0,1010	água destilada	1/1000	0,1
RMP	95	0,1053	etileno glicol	1/10 e 2/8	0,1
PZA	100	0,1	água destilada	-	0,1
SM (*)	75	0,15	água destilada	1/10 e 2/8	0,1
EMB	100	0,1	água destilada	1/10 e 2,5/7,5	0,1
ETH (*)	100	0,1	etileno glicol	1/10 e 2,2/17,5	0,1
PNB	100	0,1	propileno glicol	-	0,5
LEV/OFLO	100	0,2	água destilada	1/100	0,1
AMI	100	0,1	água destilada	1/10 e 2/8	0,1

*A pesagem dessas drogas deve ser recalculada se a potência referida pelo fabricante for diferente da apresentada na tabela acima.

7.6- LEITURA E INTERPRETAÇÃO

- a leitura é feita pelo sistema do equipamento que sinaliza a detecção de positividade. Neste caso, deverão ser verificadas através de varredura pelo leitor de código de barras todos os códigos correspondentes aos “Controles 1/100” e, se positivos, anotar o resultado como tal na planilha e o tempo de determinação, procedendo de maneira idêntica para os demais frascos do teste;
- o final do teste é indicado quando o frasco “Controle 1/100” indica positividade;
- se o tempo de positividade do frasco contendo a droga for menor que o tempo de positividade do frasco “Controle 1/100”, deve ser considerado como resistente. Se o frasco da droga estiver negativo no final do teste, a bactéria é considerada como sensível à droga;
- os resultados devem ser reportados como Resistente ou Sensível.

7.7- CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade é feito a cada partida de nova solução da droga. Será utilizada a cepa padrão de sensibilidade *M. tuberculosis* H₃₇Ra.

7.8- BIOSSEGURANÇA

Estes testes deverão ser executados segundo a técnica asséptica, em cabine de segurança biológica classe II B2 ou B3. O técnico deverá utilizar equipamentos de proteção individual, como luva, respirador N 95, avental descartável, pipetador automático, seringas com trava de agulha ou seringa de insulina com agulha fixa.

Durante o teste, as seringas utilizadas deverão ser colocadas em frasco de vidro com tampa, contendo solução de hipoclorito de sódio a 2%, de modo que a agulha fique apontada para o fundo. O frasco deverá ser tampado antes de ser retirado da cabine.

Após a execução do teste, o frasco tampado contendo as agulhas e todo o material utilizado deverá ser colocado em recipiente de aço com tampa, para ser esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização descartar pelo serviço de coleta hospitalar, privado ou público. O conteúdo dos líquidos nos frascos de ensaio, descartar no esgoto da pia sob fluxo de água corrente. Roupas, luvas, respiradores, aventais devem ser descartados em lixo comum, depois de serem autoclavadas.

7.9- MATERIAL

- amicacina;
- amostras-tipo H₃₇Ra;
- aparelho automatizado de incubação e leitura do MB/BacT;
- autoclave;
- ácido clorídrico;
- ácido p-nitrobenzóico;
- agitador de tubos (vórtex);
- água destilada;
- avental;
- balança;
- balão com pérolas de vidro;
- bécher;
- cabine de exaustão de gases;
- cabine de fluxo laminar horizontal;
- cabine de segurança biológica classe II B2/B3;
- calculadora;
- caneta hidrográfica;
- carrinho de aço;
- despertador de bancada;
- destilador;
- erlenmeyer;
- estreptomicina;
- estufa bacteriológica;
- etambutol;
- etileno glicol;
- etionamida;
- frasco de reagentes ;
- frasco de meio do sistema MB/BacT;

- geladeira;
- hidrazida do ácido tiofenocarboxílico;
- isoniazida;
- levofloxacin
- luva;
- máscara;
- ofloxacina;
- pipetador automático;
- pipetas de vidro;
- pirazinamida;
- potenciômetro;
- propileno glicol;
- proveta;
- recipiente de aço para descarte de material contaminado;
- rifampicina;
- seringa descartável de 1e de 3ml;
- suplemento antibiótico do MB/BacT;
- tubo nº1 da escala de McFarland;
- tubos 13 x 100mm.

7.10- ILUSTRAÇÕES

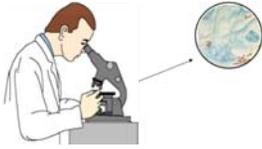


7.11- BIBLIOGRAFIA

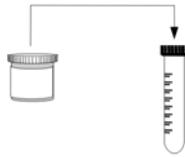
- 1- BADAQ, FZ; KISKA, DL; SETTERQUIST, S [ET ALII]. *Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens.* J Clin Microbiol, 1996; 34 (9): 2236-9.
- 2- BARRETO, AMW; ARAÚJO, JBM; MEDEIROS, RFM; CALDAS, PCS. *Direct sensitivity test of the MB/BacT System.* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002; 97: 263-264.

- 3- BARRETO, AMW; ARAÚJO, JBM; MEDEIROS, RFM; CALDAS, PCS. *Evaluation of indirect susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis to the first and second line, and alternative drugs by the newer MB/BacT System*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2003; 98: 827-830.
- 4- BEER, J; FELDMANN, K; GOGOLIN, J [ET ALII]. *Evaluation of the MB/BacT drug susceptibility system for INH, RMP, SM, EMB. A cooperative study of 6 laboratories*. Clin Microbiol Infect, 1997a ; 3: 1086.
- 5- BEER, J; KUCHLER, R; RODLOFF, AC. *Investigations about the possibility for testing the susceptibility of mycobacteria with the MB/BacT culture system*. J Lab Med, 1997b; 21: 390 -398.
- 6- BERGMANN, JS; WOODS, GL; *Mycobacterial growth indicator tube for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1997; 28 (3): 153-
- 7- BRUNELLO, F; FONTANA, R. *Reliability of the MB/BacT system for testing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex isolates to antituberculous drugs*. J Clin Microbiol 2000; 38: 872 - 873.
- 8- CUMMINGS, DM; RISTROPH D; CAMARGO, EE [ET ALII]. *Radiometric detection of the metabolic activity of Mycobacterium tuberculosis*. J Nucl Med, 1975;16 (12):1189-91.
- 9- DIAZ-INFANTES, MS; RUIZ-SERRANO, MJ; MARTINEZ-SANCHO, L; ORTEGA, A; BOUZA, E. *Evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2000; 38: 1988 -1989.
- 10- HANNA, BA; EBRAHIMZADEH, A; ELLIOTT, LB [ET ALII]. *Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria*. J Clin Microbiol, 1999; 37 (3): 748-52.
- 11- KERTCHER, JA; CHEN, MF; CHARACHE, P [ET ALII]. *Rapid radiometric susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis, 1978;117 (4): 631-7.
- 12- LASZLO, A; SIDDIQI SH. *Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the Mycobacterium tuberculosis complex by selective inhibition with p-nitro-alpha-acetylaminobeta-hydroxypropionophenone*. J Clin Microbiol, 1984; 9 (5): 694-8.
- 13- MIDDLEBROOK, G; REGGIARDO, Z; TIGERTT, WD. *Automatable radiometric detection of growth of Mycobacterium tuberculosis in selective media*. Am Rev Respir Dis, 1977; 115 (6): 1066-9.
- 14- ORGANON TEKNIKA. Manual Bact/Alert, 1997.
- 15- PFYFFER, GE; BONATO, DA; EBRAHIMZADEH, A [ET ALII]. *Multicenter Laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media*. J Clin Microbiol, 1999; 37: 3179 - 3186.
- 16- PFYFFER, GE; CIESLAK, C; WELSCHER, HM; KISSLING, P; RUSCH0GERDES, S. *Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems*. J Clin Microbiol, 1997; 35 (9): 2229
- 17- ROBERTS, GD; GOODMAN, NL; ROBERTS, GD [ET ALII]. *Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear-positive specimens*. J Clin Microbiol, 1983; 18 (3): 689-96.
- 18- SALFINGER, M; STOOL, EW; PIOT, D; HEIFETS, L. *Comparison of three methods for recovery of Mycobacterium avium complex from blood specimens*. J Clin Microbiol, 1988, 26(6):1225-6.
- 19- SIDDIQI, S; BACTEC TB SYSTEM. Product and Procedure Manual, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, 1996.
- 20- SIDDIQI, SH; LIBONATI, JP; MIDDLEBROOK, G. *Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1981;13 (5): 908-12.
- 21- STITT, DT; KODSI, SE. *A rapid method for growth and detection of Mycobacteria in clinical and stock cultures*. 94th General Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas; May 23-27,1994.
- 22- TENOVER, FC; CRAWFORD, JT; HUEBNER, RE [ET ALII]. *The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready?* J Clin Microbiol, 1993; 31: 767-770
- 23- TORTOLI, E; MATTEI, R; SAVARINO, A [ET ALII]. *Comparison of Mycobacterium tuberculosis susceptibility testing performed with BACTEC 460 TB (Becton Dickinson) and MB/BacT (Organon Teknika) systems*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000; 38: 83-86.
- 24- YEW, WW; TONG, SC; LUI, KS [E ALII]. *Comparison of MB/BacT system and agar proportion method in drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001;

ESQUEMA 1- PREPARAÇÃO DO INÓCULO E SEMEADURA NO TESTE DIRETO



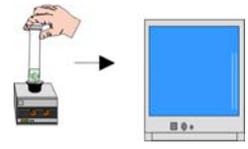
1) Preparar uma lâmina e corar pelo Ziehl Neelsen e observar se há bacilos



2) Colocar todo o material em tubo de centrifuga de plástico de 50 ml



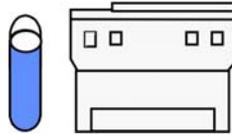
3) Adicionar a Solução A em volume igual ao do material a ser tratado



4) Agitar em Vórtex e Manter em estufa a 37° C por 24 horas



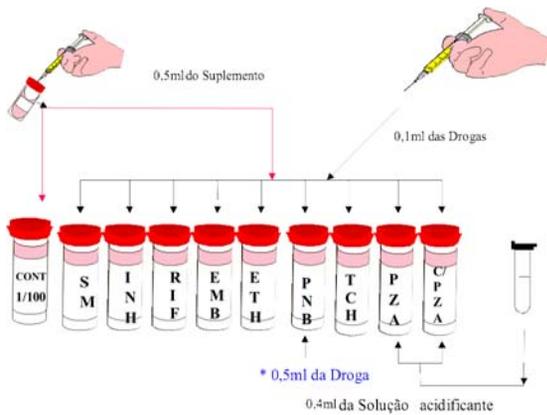
5) Neutralizar com a Solução B em igual volume da Solução A



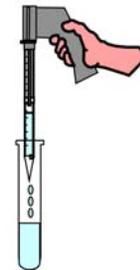
6) Centrifugar a 3.000g por 30 minutos



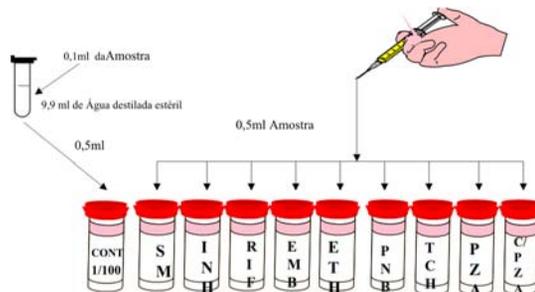
7) Desprezar o sobrenadante



8) Inocular 0,5 ml do Suplemento e 0,1 ml das Drogas a serem testadas



9) Resuspende o sedimento com 1,0ml de Água Destilada Estéril



10) Inocular o material tratado nos frascos controle e com as Drogas. Colocar no equipamento e aguardar até que o controle esteja positivo, para a análise dos resultados

ESQUEMA 2- PREPARAÇÃO DO INÓCULO E SEMEADURA NO TESTE INDIRETO



1) Pescar o maior número de colônias possível



2) Colocar no tubo com pérolas



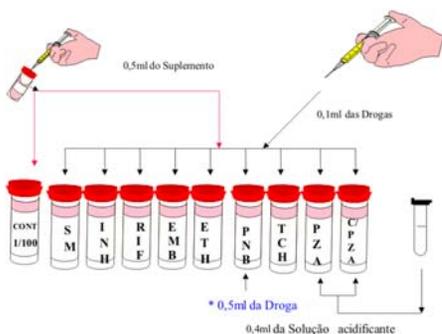
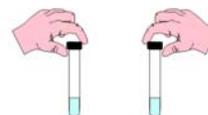
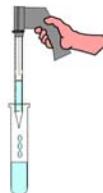
3) Agitar em Vórtex e repousar por 5 minutos



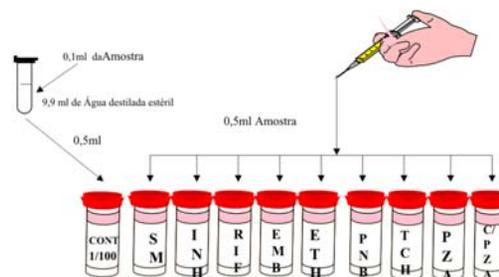
4) Adicionar 0,5 ml de Água destilada estéril, agitar em Vórtex e repousar por 5 minutos.



5) Gotear a suspensão em um tubo contendo 3ml de Água destilada estéril até obter uma turvação correspondente ao tubo nº 1 da escala de Mac Farland



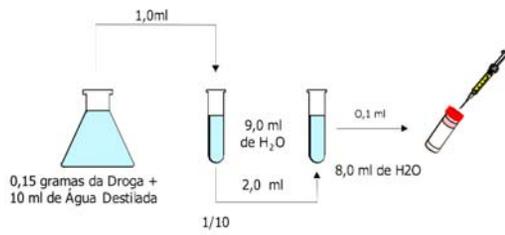
6) Inocular 0,5 ml do Suplemento e 0,1 ml das Drogas a serem testadas



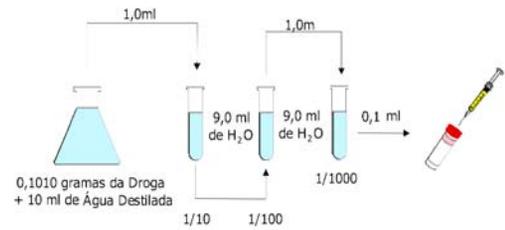
7) Inocular o material tratado nos frascos controle e com as Drogas. Colocar no equipamento e aguardar até que o controle esteja positivo, para a análise dos resultados

ESQUEMA 3- DROGAS USADAS NO MB/BACT

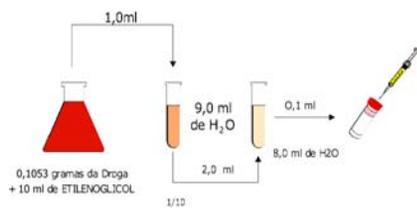
1) ESTREPTOMICINA (2µg/ml)



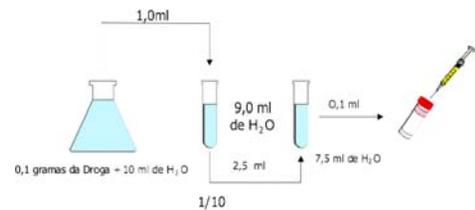
2) ISONIAZIDA(0,2µg/ml)



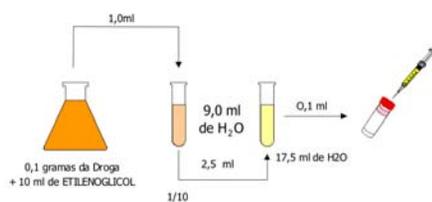
3) RIFAMPICINA (2µg/ml)



4) ETAMBUTOL (2,5µg/ml)



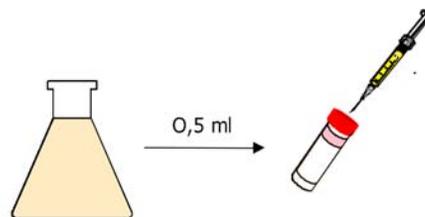
5) ETIONAMIDA (1,25µg/ml)



6) PZA (100µg/ml)

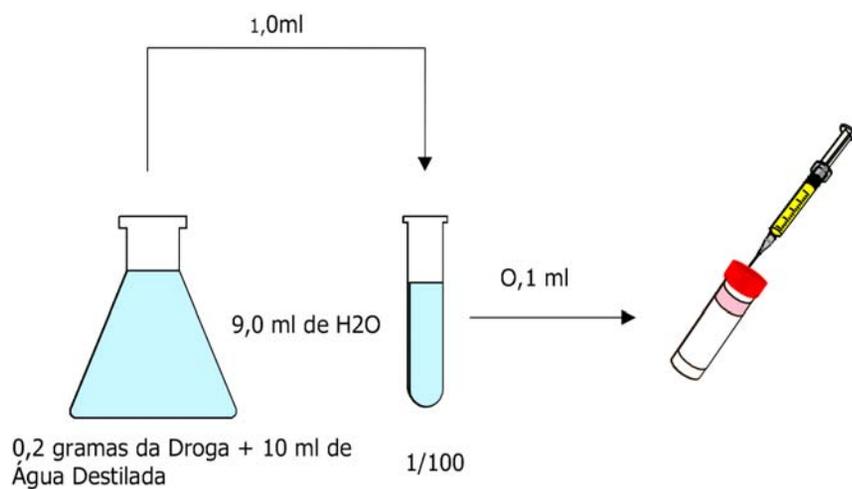


7) PNB (500µg/ml)

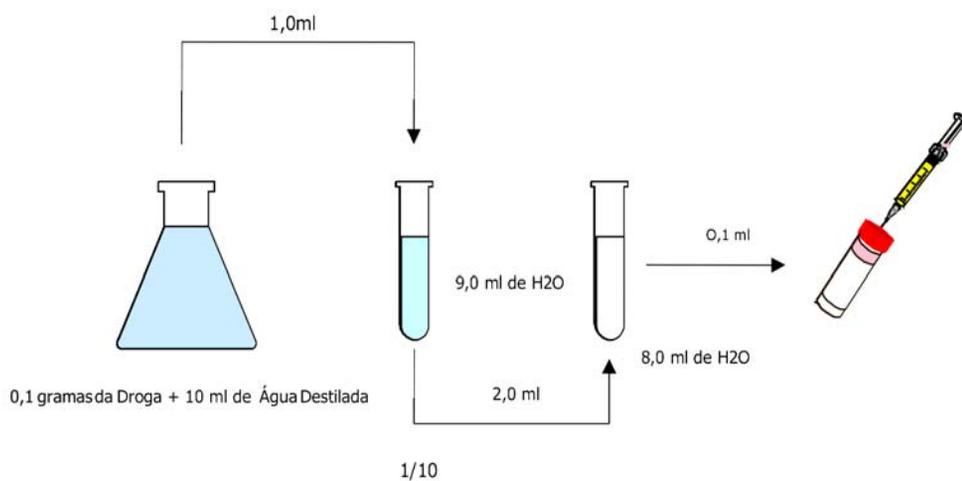


ESQUEMA 4- DROGAS ESPECIAIS PARA USO NO MB/BACT

1) OFLOXACINA (2,0 μ g/ml)



2) AMICACINA (2,0 μ g/ml)



FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DE REAGENTES
PARA TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS

DATA DE PREPARAÇÃO	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	POTÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Isoniazida				
Rifampicina				
Pirazinamida				
Estreptomina				
Etambutol				
Etionamida				
PNB				
Lev/Oflo				
Amicacina				
Propileno glicol				
Etileno Glicol				

PESAGEM / VOLUME

DROGAS	QUANT.	INCORPORAÇÃO		PARTIDA	DATA	
		DILUIÇÃO	VOLUME		PREPARO	VALIDADE
Isoniazida		1/1000				
Rifampicina		1/10 e 2/8				
Pirazinamida						
Estreptomina		1/10 e 2/8				
Etambutol		1/10 e 2,5 /7,5				
Etionamida		1/10 e 2,2/17,5				
PNB						
Lev/Oflo		1/100				
Amicacina		1/10 e 2/8				
Propileno glicol						
Etileno Glicol						

OBSERVAÇÕES

<div style="background-color: #cccccc; height: 20px; margin-bottom: 5px;"></div>
--

RESPONSÁVEL

<div style="background-color: #cccccc; height: 20px; margin-bottom: 5px;"></div>
--

FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO
ACIDIFICADORA PARA TESTE DO PZA (MB/BacT)

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SOLUÇÃO	APROVADA
HCl 2N	

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	VOLUME FINAL	INCORPORAÇÃO DO MEIO
HCl 0,2N			

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 3- LEITURA DO TESTE NO MB/BACT

NÚMERO DA AMOSTRA	DATA DE ENTRADA

CÓDIGO	DROGAS LOTE:_____	RESULTADO	TEMPO	RESULTADO FINAL
	CONTROLE			
	SM			
	INH			
	RMP			
	EMB			
	ETH			
	C:1/100			
	PNB			
	PZA			
	C/PZA			
REALIZADO POR:		LEITURA POR:		
ANALISADO POR:		LIBERADO:		



Capítulo 8

*CONTROLE DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE
MICOBACTERIOLOGIA*

8.1- INTRODUÇÃO

O controle da qualidade dos exames laboratoriais é uma atividade de importante relevância para a produção de resultados confiáveis e reprodutíveis. Este pode ser considerado uma atividade operacional preventiva à medida que fornece em “tempo real”, a informação sobre o desempenho do processo investigativo.

O controle da qualidade compreende o monitoramento da competência do pessoal técnico, o gerenciamento do comportamento dos instrumentos e equipamentos críticos, o monitoramento e controle das condições ambientais e de biossegurança, a atualização das metodologias e procedimentos utilizados, o monitoramento da qualidade dos materiais e reagentes utilizados, e o monitoramento do processo global de exame através da utilização de amostras, tipo de fornecedor confiável, padrões rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI) e amostras de controle.

Além das técnicas citadas acima, é de primordial importância a participação do laboratório em ensaios de proficiência, com o objetivo de fornecer informações sobre o comportamento do laboratório em relação aos demais que realizam os mesmos exames, e sobre a competência técnica do pessoal. Tanto quanto possível todos os dados de controle da qualidade devem estar baseados em técnicas estatísticas. O controle deve ficar a cargo dos membros do Comitê da Qualidade. No entanto, a responsabilidade é dividida com toda a equipe do laboratório.

8.2- RECOMENDAÇÕES GERAIS

- todos os dados referentes ao controle de qualidade devem ser registrados em fichas adequadas para cada procedimento, e monitorado diariamente pelo supervisor dos exames, a fim de corrigir os problemas a tempo de não invalidá-los, e analisados criticamente pelo Comitê da Qualidade em sua reunião periódica;
- toda a metodologia realizada no laboratório deve estar detalhadamente descrita e atualizada em um manual de procedimentos, de modo a facilitar a execução dos exames pelo pessoal habilitado. Os métodos usados rotineiramente devem ser aqueles publicados em normas internacionais, regionais e nacionais, ou aqueles que tenham sido publicados em livros clássicos de microbiologia, manuais ou publicações específicas. Procedimentos não descritos em publicações podem ser utilizados desde que tenham sido desenvolvidos sob controle experimental confiável, validados, e que estejam aceitos para publicação;
- o prazo de validade de todo o material (meios de cultura, corantes, reagentes, antibióticos e outros) deve ser observado no momento da aquisição, assim como o certificado de análise do produto, a sua armazenagem correta no laboratório (geladeira, freezer, dessecador, ao abrigo da luz, etc). As substâncias tóxicas, inflamáveis e explosivas etc. devem ser respectivamente rotuladas como tal e armazenadas segundo as normas de segurança química (ver Capítulo BIOSSEGURANÇA);
- os meios de cultura, corantes e reagentes preparados no laboratório devem ser rotulados com o nome, concentração e a data da preparação, prazo de validade, assinatura do responsável pela preparação e lote de origem. Esses devem ser periodicamente observados quanto à presença de contaminantes, alteração de cor, formação de precipitado etc. A marca e o número do lote do produto utilizado devem ser sempre registrados numa ficha quando houver mudança de frasco;

- a água utilizada para as análises do laboratório deve ser filtrada em filtro de areia e de carvão ativado, para retenção de materiais particulados, absorção de contaminantes orgânicos e cloro, facilitando com isso o trabalho das colunas deionizadoras, e depois deionizada. Após a deionização a água pode ser sanitizada através do processo de autoclavação ou esterilização por luz ultravioleta. O pH deve ser medido logo após cada deionização e deve estar entre 5,0 e 7,0. Assim a água apresentará qualidade para o preparo dos reagentes utilizados nos exames. Anotar os resultados de cada deionização na ficha 1 “Controle de Qualidade da Água Deionizada” (ver anexo).

8.3- EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO

Os equipamentos devem ser utilizados seguindo as recomendações do fabricante, para permitir maior vida útil, e regularmente monitorados pelo usuário para assegurar a precisão e exatidão necessárias.

Caso apresentem comportamento suspeito e indícios de defeito, deve-se tomar o cuidado de segregá-los e fixar uma etiqueta ou aviso para evitar o uso inadvertido por outra pessoa. Após a manutenção ou calibração e antes do uso, o equipamento deve ser testado para evidenciar a sua adequação. As manutenções, controle de rotina e calibração devem ser registrados.

Observação: Nos locais com grande variação de tensão, é recomendável o uso de reguladores de voltagem, especialmente nos aparelhos que apresentam maior sensibilidade a essas variações, como: balança, medidor de pH, microscópio, aparelhos gerenciados por computador etc. Nas salas úmidas e em equipamentos mais sensíveis à umidade, como é o caso dos microscópios, é recomendável o uso de desumidificador ou ambientes aquecidos a seco.

Alguns equipamentos não descritos neste capítulo podem ser controlados através da anotação no “Livro de Registro de Ocorrências do Laboratório”, como é o caso das centrífugas, potenciômetros, balanças, deionizadores, microscópios etc. Caso apresentem defeitos, estes serão comunicados pelo usuário a um membro do Comitê da Qualidade que fará o registro no livro e que comunicará o ocorrido ao chefe do laboratório para providências cabíveis.

8.3.1- AUTOCLAVE

A cada autoclavação a temperatura deverá ser registrada na Ficha 2 “Controle de Esterilização por Autoclave” (ver anexo), assim como a eficiência da esterilização deverá ser verificada através do uso da fita adesiva indicadora apropriada, termosensível, usada no acondicionamento de todo o material ou através de controle biológico. Para um processo eficiente de esterilização deve-se assegurar que o vapor penetre facilmente através de todo material contido na autoclave. Por essa razão não se deve colocar material em excesso. É fundamental a eliminação de todo o ar residual, antes de começar a contar o tempo do processo, de modo a utilizar apenas o vapor d’água superaquecido. A esterilização em autoclave é feita a 121°C durante 15 a 20 minutos. Periodicamente, deve-se verificar se há perda de vapor nas juntas e na tampa; se a borracha de vedação está danificada ou ressecada; se há formação de incrustações na caldeira e, dependendo da utilização do equipamento, o mesmo deverá ser submetido à prova hidráulica da câmara, conforme NR 13 do Ministério do Trabalho, para detectar possíveis fugas e verificar soldaduras. O interior deve ser lavado mensalmente ou até semanalmente se muitos resíduos acumularem-se no fundo. A calibração do manômetro e do termômetro, bem como o controle da válvula de segurança, devem ser feitos anualmente.

8.3.2- CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA (CSB)

O componente mais delicado da cabine de segurança biológica é o filtro HEPA (high efficiency particulate air). Então toda manipulação nas CSB deve zelar pela integridade dos filtros e pela garantia de não contaminação do operador e dos materiais que estão sendo manipulados. A cabine deve ser munida de manômetro para permitir o controle periódico do fluxo do ar. A manutenção deste equipamento é feita por técnico especializado, a cada ano, de preferência indicado pelo próprio fabricante. A revisão inclui também a inspeção e troca da lâmpada germicida. A troca de filtros é geralmente recomendada após 2 anos de utilização, mas dependendo do manuseio da cabine, da qualidade do ar do laboratório e do próprio equipamento, esse prazo pode ser maior. A utilização diária da CSB requer cuidados:

- ligar a cabine 30 minutos antes de começar o trabalho, inclusive a lâmpada UV;
- desligar e passar um pano limpo embebido com álcool a 70% no interior da CSB, incluindo a lâmpada germicida, colocando apenas o antebraço e as mãos no seu interior (nunca a cabeça);
- planejar a realização do trabalho com antecedência e arrumar todo o material necessário de forma a que as manipulações não provoquem gestos bruscos que possam alterar o fluxo de ar;
- ao terminar o trabalho, retirar todo o material, passar um pano limpo embebido com álcool a 70% no interior e ligar a lâmpada UV durante 30 minutos antes de encerrar o trabalho;
- anotar na ficha 3 “Manipulação na CSB” toda vez que for manipular.

8.3.2.1- Descontaminação da CSB

Para evitar a contaminação do técnico, antes de fazer a visita para a manutenção ou conserto da cabine a descontaminação do aparelho é obrigatória. A descontaminação é feita com formaldeído gasoso, produzido pela despolimerização térmica do paraformaldeído. Para calcular seu peso em gramas é necessário multiplicar o volume total da área de trabalho (altura x largura x comprimento) por 0,25. Pesar o paraformaldeído num bécher e colocá-lo sobre uma placa aquecedora no centro da bancada da cabine. Em outra placa, colocar um bécher com água para elevar a umidade relativa do ar, que deve ser de no mínimo 60%, durante o processo de descontaminação. Após fechar hermeticamente todas as aberturas da cabine, ligar as placas aquecedoras acionadas remotamente e só desligá-las uma hora depois ou quando o pó tiver sublimado. Deixar o equipamento tampado e desligado por toda a noite. Pela manhã ligar a cabine e deixar operando por uma hora para retirar todo o resíduo do gás. Anotar na ficha 4 “Controle da Descontaminação da CSB”.

ATENÇÃO: O formaldeído é um gás cáustico para a pele e irritante para pele e mucosas (olhos, trato respiratório). Esta operação só deve ser feita por pessoal usando máscara semifacial em silicone, luvas de borracha natural ou PVC, óculos e avental de tyvek. Consultar o Capítulo BIOSSEGURANÇA.

8.3.3- CENTRÍFUGA

Estes aparelhos devem ser equipados de tacômetro para controlar a força centrífuga. Para a sedimentação de micobactérias a força centrífuga ideal é acima de 3.000 x g. O uso do rotor do tipo angular (45°) é o mais adequado, pois minimiza a resistência do ar e a elevação da temperatura

durante a centrifugação. Além disso elas devem ser refrigeradas e os rotores devem ter tampa de vedação (“aerosol free”) e só devem ser abertos dentro das cabines de segurança para a retirada dos tubos. Este aparelho deve ser calibrado anualmente. Quando necessário, após cada uso, deve ser realizada a desinfecção do rotor. A operação destes aparelhos é descrita de modo geral:

- ligar;
- ajustar a temperatura para 13°C, com um toque no botão indicado no painel frontal;
- ajustar a força centrífuga para 3000 x *g* com um toque no botão indicado no painel;
- ajustar o tempo de centrifugação para 30 minutos com um toque no botão indicado no painel;
- arrumar os tubos dentro do porta-tubos de modo que os tubos diametralmente opostos tenham o mesmo peso;
- fechar a tampa do rotor, rosqueando o parafuso;
- tampar a centrífuga;
- ligar e deixar completar o programa;
- destampar a centrífuga e retirar o rotor com os tubos;
- **Só abrir a tampa do rotor dentro da cabine de segurança.**

8.3.4- CABINE DE EXAUSTÃO QUÍMICA (CEQ)

Esse aparelho é um grande auxiliar que garante a segurança nas manipulações químicas e para que isso ocorra a utilização desse equipamento deve ser rigorosamente observada. Anotar as observações de cada tarefa na ficha 5 “Manipulação na CEQ”.

- arrumar todo o material na capela química (reagentes, vidraria, porta-pipetas, pipetador automático). **A cabine só deve conter materiais e frascos de reagentes que vão ser utilizados naquela manipulação;**
- ligar;
- verificar se a fita está acenando para dentro da cabine (fita indicativa de pressão negativa);
- limitar os movimentos dos braços, movê-los retilinearmente para dentro e para fora, **devagar**;
- manter a vidraça no ponto de segurança mais baixo;
- assegurar-se de que as aberturas na parte de trás da cabine não estejam obstruídas;
- não desligar a cabine até que os produtos químicos sejam retirados.

8.3.5- ESTUFA BACTERIOLÓGICA (36° ± 1° C)

A temperatura deve ser observada diariamente em vários locais dentro da estufa, anotada na ficha 6 “Controle de Temperatura da Estufa Bacteriológica” (anexa) usando termômetros de mínima e máxima controlados externamente com certificado de calibração. O uso de qualquer luz no interior da estufa deve ser restrito. A intervalos pré-determinados deve ser feita uma verificação da uniformidade da temperatura.

Como existe a possibilidade de haver quebra ou mesmo a abertura involuntária de tampa de tubos no interior da estufa, recomendamos que seja instalado um sistema de desinfecção de ar através de radiação ultravioleta para o controle interno dessas possíveis contaminações. Ver descrição do aparelho no Capítulo 10 SOLUÇÕES E REAGENTES. MATERIAL UTILIZADO NO LABORATÓRIO.

8.3.6- MICROSCÓPIO

Após exame diário de lâminas, a objetiva de imersão deve ser limpa com gaze embebida levemente com xilol (usar luva de borracha nitrílica), para que o excesso não descole as lentes. O microscópio deve ficar protegido da poeira e da umidade com uma capa de pano de algodão, que possa ser lavada periodicamente. Efetuar limpeza geral, revisar o circuito elétrico de iluminação, os sistemas ótico e mecânico anualmente.

8.3.7- COAGULADOR

O coagulador deve manter em seu interior uma temperatura constante de 80° a 85°C. Em alguns casos, os coaguladores apresentam temperaturas mais altas próximo às paredes e da resistência e os tubos colocados nas extremidades podem sofrer superaquecimento. O tempo máximo de coagulação é de 50 minutos. Anotar a temperatura de cada processo na ficha 7 “Controle de Temperatura do Sorocoagulador”. A exemplo das estufas bacteriológicas, deve ser verificada a distribuição de calor no seu interior.

8.3.8- GELADEIRA (2-8°C)

Verificar a temperatura diariamente com termômetro digital externo e calibrado, cujo sensor esteja localizado internamente ou com o de mínima e máxima calibrado colocado no interior. Anotar na ficha 8 “Controle de Temperatura da Geladeira”. Descongelar e limpar mensalmente. Passar pano de limpeza com álcool a 70% se a geladeira armazenar material contaminado e só depois lavar com um pano com água e detergente.

Como existe a possibilidade de haver quebra ou mesmo abertura involuntária de tampa de tubos ou potes de escarro e outros materiais no interior da geladeira, recomendamos que seja instalado um sistema de desinfecção de ar através de radiação ultravioleta para o controle interno dessas possíveis contaminações. Ver descrição do aparelho no Capítulo 10.

8.3.9- FREEZER (0 A -70°C)

A exemplo da geladeira, verificar a temperatura diariamente e anotar na ficha 9 “Controle de Temperatura do Freezer”. Descongelar e limpar a cada ano, com os procedimentos utilizados para a geladeira.

8.3.10- BALANÇA ANALÍTICA DE PRECISÃO

Cuidados especiais devem ser tomados para a operação adequada das balanças analíticas. Estas devem estar situadas sobre uma mesa ou bancada isenta de trepidações, caso contrário seu mecanismo interno se desgastará, danificando-as. Deve ser observado o seu nível, o que evitará o empeno do mecanismo de sustentação dos pratos. Sob hipótese alguma seu mecanismo interno poderá ser mexido.

Após o uso deverá ser removido todo o resíduo do material que foi pesado. Sua calibração anual deve ser feita por laboratório que possa fornecer rastreabilidade do SI.

Entre as calibrações devem ser feitas verificações da validade das mesmas pela utilização de massas calibradas na faixa de uso das balanças.

Outros cuidados na instalação das balanças:

- não instalar em frente ou ao lado de janelas, para evitar o aquecimento por radiação solar;
- não instalar aquecedores nas proximidades, pois além da radiação térmica, produzem correntes de ar relativamente fortes;
- instalar em local protegido de correntes de ar;
- ambiente onde são realizadas as pesagens deve ter umidade controlada (55% ±5%);
- as mesas de instalação das balanças devem ser com tampo de mármore ou concreto maciço, com o fundo apoiado sobre neoprene ou material similar, a fim de minimizar as vibrações. As balanças podem também ser instaladas sobre suportes, porém devem ser evitadas as colocações combinadas de suportes no solo e na parede, evitando uma conjugação de trepidações;
- a mesa deve ter um tamanho que evite que o operador apóie-se sobre o tampo.

OBS: Nos locais com grande variação de tensão, é recomendável o uso de reguladores de voltagem, especialmente nos aparelhos que apresentam maior sensibilidade a essas variações, como: balança, medidor de pH, microscópio, geladeira, estufas etc. Nas salas úmidas e em equipamentos mais sensíveis à umidade, como é o caso dos microscópios, é recomendável o uso de desumidificador ou ambientes aquecidos a seco.

8.3.11- MB/BACT

Os cuidados tomados para a operação deste aparelho estão diretamente ligados à manutenção da gravação dos dados produzidos diariamente pelo sistema e do controle das células leitoras do fundo dos tubos. A manutenção do aparelho é oferecida pela firma em tempo integral, de forma corretiva.

8.4- VIDRARIA

Antes de colocar o meio nos tubos é necessário que eles estejam bem limpos. Não é suficiente que tenham sido esterilizados, pois os resíduos alteram a qualidade do meio de cultura. A alcalinidade dos tubos influi desfavoravelmente na composição do meio, por isso deve-se adquirir vidro neutro. Também é freqüente observar tubos alcalinizados (o meio adquire cor esbranquiçada na parte que está em contato com o tubo) quando são lavados com soluções detergentes com alta concentração de soda. Para evitar isso, é necessário enxaguar exaustivamente com água destilada.

8.5- MANUTENÇÃO DE AMOSTRAS-TIPO DE MICOBACTÉRIAS

Preparar suspensões em 2ml de salina fisiológica ou água destilada estéril ou em meio líquido de 7H-9 e estocar no freezer. Alternativamente, culturas podem ser semeadas no meio líquido de 7H-9 e quando apresentarem crescimento, estocar no freezer. A maioria das espécies, inclusive *M. tuberculosis*, perdem a validade quando armazenadas por mais de 1 ano a -20°C, mas se mantêm válidas e com as características inalteradas a -70°C por mais de 2 anos.

8.6- TÉCNICAS LABORATORIAIS

8.6.1- BACILOSCOPIA

Antes da preparação dos corantes deve-se verificar a potência dos mesmos e corrigir a massa a ser pesada para que se trabalhe sempre com 100% do corante ativo. O controle de qualidade deve ser feito cada vez que são preparados, utilizando-se lâminas sabidamente positivas para testar a coloração. Sempre que apresentarem precipitados ou, mudança na coloração, devem ser descartados. Anotar na ficha 10 “Controle da Solução de Fenol Líquido Para o Método de Coloração de Ziehl Neelsen” e na ficha 11 “Controle da Preparação dos Corantes Para o Método de Coloração de Ziehl Neelsen”.

8.6.2- MEIO DE CULTURA

Cada partida de meio de cultura preparada no laboratório ou adquirida comercialmente deve ser avaliada quanto à esterilidade e sensibilidade no isolamento de micobactérias. Esta última deve ser realizada utilizando uma suspensão padronizada de *M.tuberculosis* (H₃₇Rv ou H37Ra) com contagem de viáveis previamente conhecida. Geralmente a diluição 10⁻⁵ desta suspensão (conforme preparada para teste de sensibilidade, ver o capítulo), contém de 50 a 150 unidades formadoras de colônias em 0,1ml. Estes resultados devem ser anotados em ficha própria Meios de qualidade inferior geralmente não propiciam crescimento de colônias nesta diluição. Anotar na ficha 12 “Controle de Produção de Meio de Cultura Lowenstein Jensen”.

Na preparação do meio de Lowenstein-Jensen observar que:

- a temperatura e o tempo de coagulação devem ser controlados e registrados;
- após a coagulação, os tubos de meio deverão ficar 24 horas a temperatura ambiente com as tampas afrouxadas, para controlar a esterilidade e eliminar a água de condensação. Após esse período os tubos devem ser bem fechados e guardados em geladeira a 4°C por no máximo 2 meses;
- os ovos utilizados no preparo do meio devem ser frescos e preferencialmente provenientes de galinhas de granja, cuja alimentação seja isenta de antibióticos (ovos para fins biológicos).

O meio de 7H-9 de Middlebrook é preparado de acordo com o fabricante e o controle de esterilidade é feito deixando-se os tubos 24 horas em temperatura ambiente após serem distribuídos. O controle de qualidade da partida é feito com uma amostra de *M. avium* durante a prova do telurito de potássio. Os resultados serão anotados na ficha 13 “Controle de Produção de Meio de Cultura 7H9 de Middlebrook”.

8.6.3- DESCONTAMINAÇÃO DE ESPÉCIMES

O controle deste procedimento deve ser feito mensalmente para avaliar o percentual de culturas contaminadas, por metodologia utilizada, através da marcação na agenda de anotação das sementeiras e leituras diárias do trabalho, das amostras processadas que foram contaminadas (ver ficha 14 “Índice de Contaminação”).

Obs: Cuidado ao semear ou repicar as culturas na cabine de segurança de modo a evitar que os aerossóis produzidos pela manipulação provoquem miniepidemias em outras culturas, ou seja, isolamentos repetidos de micobactérias saprófitas e de cultura mista de micobactérias. Aguarde alguns minutos entre uma sementeira e outra.

8.6.4- TESTE DE SENSIBILIDADE

Cada partida de meio com drogas preparadas deve ser sempre avaliada semeando-se uma amostra padrão de *M.tuberculosis* (H₃₇Rv ou H₃₇Ra) que mostram-se sensíveis às drogas utilizadas nos esquemas de tratamento (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol, Etionamida e Estreptomomicina). Adicionalmente, outras amostras-tipo podem ser utilizadas, para avaliar determinadas drogas, como é o caso de *M. fortuitum*, que é sensível a Etionamida e *M. bovis* BCG, que é resistente a Pirazinamida. Outras drogas incorporadas ao Lowenstein Jensen, tais como Cicloserina, Ofloxacina, Amicacina, Ácido p-nitrobenzóico e Hidrazida do ácido tiofenocarboxílico têm a qualidade controlada quando semeadas com a cepa padrão H₃₇Ra. Todas as etapas da preparação do meio com droga como: cálculo da potência da drogas, pesagem, diluição, volume de incorporação da droga no meio, data da preparação devem ser anotadas em fichas próprias (Ficha 15 “Controle dos Reagentes Para Teste de Sensibilidade às Drogas”), assim como os resultados dos testes com as amostras-padrão. A leitura do teste de sensibilidade não deve ultrapassar a 20 dias, pois falsa resistência a drogas pode ser observada, principalmente a etionamida, estreptomomicina e etambutol, que se degradam pelo calor da incubação prolongada. Anotar na ficha 16 “Leitura de Resultados de Teste de Sensibilidade”. O meio com drogas, após a coagulação e controle de esterilidade (que é o mesmo da preparação do meio de cultura) deve ser guardado em geladeira a 4°C por no máximo 1 mês.

8.6.5- IDENTIFICAÇÃO

O laboratório que realiza identificação de micobactérias deve ter amostras-tipo provenientes de coleções internacionalmente reconhecidas e certificadas, para controlar a qualidade dos testes bioquímicos. O controle de qualidade de cada uma das técnicas está descrito no Capítulo 5 IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS, assim com as fichas para anotação de cada procedimento.

8.7- BIBLIOGRAFIA

- 1- BARTLETT, RC. “Quality control in clinical microbiology”. In: LENETTE, EH; BALLOWS, A; HAUSLER JR, WJ; SHADOMY, HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington : American Society for Microbiology, 1985, 4th ed., p 14.
- 2- BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI/CRPHF. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 1994. 2 ed. revisada e ampliada.
- 3- STRONG, B. E. & KUBICA, G.P. *Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis. A Guide for the Level II Laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control, 1991.
- 4- INMETRO. *Guia para laboratórios químicos; um auxílio à Organização e ao Credenciamento*. Interciência, 2000.

FICHA 3- MANIPULAÇÃO NA CSB

MARCA	PATRIMÔNIO	SALA

MÊS	ANO

DIA	PROCEDIMENTOS							
	Verificação de material contaminado	Desinfecção da cabine	Verificação das lâmpadas	Verificação dos filtros/manômetros	Ligar 30 minutos antes uso	2ª Desinfecção da cabine	30 min de luz UV após trabalho	Verificação do total desligamento
01								
02								
03								
04								
05								
06								
07								
08								
09								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								

FICHA 4- CONTROLE DA DESCONTAMINAÇÃO DA CSB

EQUIPAMENTO	MODELO	PATRIMÔNIO	SALA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Formaldeído			

FORMALDEÍDO (g)	TEMPO DE DESCONTAMINAÇÃO

USO DE EPIs

- () MÁSCARA
- () LUVAS
- () ÓCULOS
- () AVENTAL

DATA

____ / ____ / ____

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 5- MANIPULAÇÃO NA CEQ

MARCA	PATRIMÔNIO	SALA

MÊS	ANO

DIA	PROCEDIMENTOS				
	Verificação de reagentes deixados	Arrumação da cabine	Verificação do fluxo de ar	Verificação do total desligamento	Observações
01					
02					
03					
04					
05					
06					
07					
08					
09					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					

CONTROLE ANUAL REALIZADO EM
 / / (relatórios)

FICHA 6- CONTROLE DE TEMPERATURA DA ESTUFA BACTERIOLÓGICA

MARCA	PATRIMÔNIO	TEMPERATURA DE TRABALHO DO APARELHO				
MÊS		ANO				
DIA	TEMPERATURA ° C			HORA	RESPONSÁVEL	OBSERVAÇÕES
	Mínima	máxima	atual			
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
IDENTIFICAÇÃO DO TERMÔMETRO				PATRIMÔNIO		

FICHA 7- CONTROLE DE TEMPERATURA DO SOROCOAGULADOR

MARCA	PATRIMÔNIO	TEMPERATURA DE TRABALHO DO APARELHO

MÊS	ANO

DIA	TEMPERATURA ° C			HORA	RESPONSÁVEL	OBSERVAÇÕES
	Mínima	máxima	atual			
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

IDENTIFICAÇÃO DO TERMÔMETRO	PATRIMÔNIO

FICHA 8- CONTROLE DE TEMPERATURA DA GELADEIRA

MARCA	PATRIMÔNIO	SALA	TEMPERATURA DE TRABALHO DO APARELHO			
MÊS			ANO			
DIA	TEMPERATURA ° C			HORA	RESPONSÁVEL	OBSERVAÇÕES
	Mínima	máxima	atual			
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
IDENTIFICAÇÃO DO TERMÔMETRO				PATRIMÔNIO		

FICHA 9 -CONTROLE DE TEMPERATURA DO FREEZER

MARCA	PATRIMÔNIO	SALA	TEMPERATURA DE TRABALHO DO APARELHO			
MÊS		ANO				
DIA	TEMPERATURA ° C			HORA	RESPONSÁVEL	OBSERVAÇÕES
	Mínima	máxima	atual			
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
IDENTIFICAÇÃO DO TERMÔMETRO				PATRIMÔNIO		

FICHA 10- CONTROLE DA SOLUÇÃO DE FENOL LÍQUIDO
 PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Fenol Cristalizado			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

<table border="1"> <tr> <th>SUBSTÂNCIA</th> <th>QUANTIDADE</th> </tr> <tr> <td>Fenol Cristalizado</td> <td></td> </tr> <tr> <td>H₂O destilada</td> <td></td> </tr> </table>		SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	Fenol Cristalizado		H ₂ O destilada	
SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE						
Fenol Cristalizado							
H ₂ O destilada							

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--

RESPONSÁVEL

--

FICHA 11- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
PARA O MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE	
Fucsina Básica				
Álcool etílico 95% PA				
Fenol Cristalizado				
Azul de Metileno				
Hcl				
PESAGEM / VOLUME				
SUBSTÂNCIA	CORANTES	ÁLCOOL ETÍLICO	FENOL LÍQUIDO	H ₂ O DESTILADA
Fucsina Básica				
Azul de Metileno				
Hcl				
CONTROLE DE QUALIDADE				
APROVADO () REPROVADO ()				
OBSERVAÇÕES				
RESPONSÁVEL				

FICHA 14- ÍNDICE DE CONTAMINAÇÃO

MÉTODO	Nº DE TUBOS		MÊS	PERCENTUAL	RESPONSÁVEL
	TOTAL	CONTAMINADOS			
			Janeiro		
			Fevereiro		
			Março		
			Abril		
			Maio		
			Junho		
			Julho		
			Agosto		
			Setembro		
			Outubro		
			Novembro		
			Dezembro		
TOTAL GERAL					
OBSERVAÇÕES					

FICHA 15- CONTROLE DOS REAGENTES
PARA TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS

DATA DE PREPARAÇÃO	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	POTÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
INH				
RMP				
PZA				
SM				
EMB				
ETH				
PNB				
TCH				
OFLO 2				
CS				
HX				
Etileno Glicol				
Propileno glicol				

PESAGEM / VOLUME

DROGAS	QUANT.	H ₂ O DESTIL.	INCORPORAÇÃO		PARTIDA	DATA	
			DILUIÇÃO	VOLUME		PREPARO	VALIDADE
INH		*	1/100				
RMP							
PZA							
SM			1/10				
EMB			1/10				
ETH		*					
PNB		**					
TCH			1/10				
OFLO			1/10				
CS							
HX							

*ETILENO GLICOL

**PROPILENO GLICOL

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 16- LEITURA DE RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE

NÚMERO		ANO				LOTE					
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA				LOTE					
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		INH	PZA	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH
		LJ	LJ/PZA								
10 ³	20										
10 ⁵	20										
10 ⁶	20										
Percentagem											
Diagnóstico											
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR									

AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA				LOTE					
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		INH	PZA	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH
		LJ	LJ/PZA								
10 ³	20										
10 ⁵	20										
10 ⁶	20										
Percentagem											
Diagnóstico											
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR									

AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA				LOTE					
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		INH	PZA	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH
		LJ	LJ/PZA								
10 ³	20										
10 ⁵	20										
10 ⁶	20										
Percentagem											
Diagnóstico											
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR									



Capítulo 9

*REGISTRO DE EXAMES FLUXO E
RASTREABILIDADE*

9.1- REGISTRO DE INFORMAÇÃO

Os laboratórios integrantes ou vinculados à Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública devem dispor de um sistema de registro interno que possibilite fornecer, além do resultado do exame ao solicitante, informações indispensáveis para a Vigilância Epidemiológica da Tuberculose e para a Coordenação Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Visando padronizar estas informações, o Centro de Referência Professor Hélio Fraga elaborou o “Livro de Registro de Baciloscopia e de Cultura para o Diagnóstico e Controle da Tuberculose” (livro branco) . Este livro vem sendo amplamente utilizado em todas as unidades laboratoriais e Laboratório Central (LACENs) das capitais, sendo fornecido gratuitamente pelo CRPHF. O modelo da folha de preenchimento do livro é apresentado em anexo.

Com o objetivo de disponibilizar os dados laboratoriais contidos no livro branco de forma mais ampla e ágil, foi desenvolvido também pelo CRPHF um sistema de informação laboratorial informatizado “SILTB – Sistema de Informação Laboratorial da Tuberculose”. Esse sistema apresenta uma versão para ser utilizada em unidades laboratoriais (SILTB-UL) e uma versão para os laboratórios estaduais e regionais (SILTB-LACEN).

O SILTB-LACEN permite, além do armazenamento de dados laboratoriais, a avaliação da qualidade das baciloscopias realizadas nas unidades laboratoriais e a emissão de relatórios consolidando informações da rede de laboratórios, por município. O controle de qualidade é feito a partir de um banco de replicação gerado aleatoriamente, que inclui todas as lâminas positivas mais 10% das negativas recebidas de um determinada unidade laboratorial em um determinado período. Após a revisão destas lâminas pelo LACEN será realizada a análise de concordância. O sistema disponibiliza informações como a positividade da baciloscopia e da cultura, número de sintomáticos respiratórios examinados, pacientes novos diagnosticados, total de exames realizados entre outras. Estas informações podem ser obtidas para um determinado laboratório ou município e podem ser impressas na forma de relatórios incluindo o resultado dos exames por paciente diagnosticado.

Além do sistema SILTB, os LACENs deverão dispor de outro sistema informatizado para atender as necessidades da rotina dos exames de maior complexidade realizados em seus serviços.

9.2- FLUXO E RASTREABILIDADE DOS EXAMES REALIZADOS

Uma vez registrado no programa SILTB, o material recebido terá um fluxo no laboratório dependente do tipo de exame solicitado. Para sinalizar e instruir os técnicos do laboratório que procedimentos deverão ser executados, fichas internas de trabalho precisam ser padronizadas. Além das agendas, que orientam os técnicos na programação dos testes e preparação de material a ser utilizado no laboratório, as fichas permitem o rastreamento dos exames realizados de forma a garantir a confiabilidade de seus resultados. A seguir serão detalhadas as fichas empregadas de acordo com o tipo de exame solicitado, tomando como base aquelas que são utilizadas na nossa rotina. (fichas em anexo)

9.2.1- FICHA 1 “ESPÉCIME CLÍNICO PARA CULTURA, IDENTIFICAÇÃO E/OU TESTE DE SENSIBILIDADE”

Se o exame solicitado for cultura ou teste de sensibilidade direto, a ficha “Espécime Para Cultura, Identificação e/ou Teste de Sensibilidade” deverá ser preenchida inicialmente. Os campos desta ficha são preenchidos a partir da ficha de entrada gerada no sistema de registro geral do laboratório.

9.2.2- FICHA 2 “CULTURAS ENCAMINHADAS PARA TESTE DE SENSIBILIDADE E/OU IDENTIFICAÇÃO”

Todas as culturas encaminhadas por outras instituições devem ser listadas nesta ficha.

9.2.3- FICHA 3 “CULTURAS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE”

Os isolamentos obtidos no laboratório com solicitação de teste de sensibilidade (antibiograma) e as culturas recebidas para este exame deverão ser relacionados nesta ficha para a consumação do teste solicitado. No antibiograma, deverá ser assinalado o tipo de teste a ser executado: se teste para 6 drogas, que compreende isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, estreptomicina, etionamida e/ou um teste com drogas especiais, como por exemplo, ofloxacina e amicacina.

9.2.4- FICHA 4 “LEITURA E REGISTRO DOS RESULTADOS DE CULTURA”

Os resultados dos exames são anotados em fichas de leitura específicas para cada tipo exame. Nesta ficha anotamos os resultados do exame de cultura anotando o número da amostra e o resultado observado. A partir delas, os resultados são transferidos para o SILTB ou outro sistema que informe o resultado ao paciente.

9.2.5- FICHA 5 “LEITURA E REGISTRO DE RESULTADO DE TESTE DE SENSIBILIDADE”

Nesta ficha serão feitas todas as leituras dos crescimentos obtidos nos tubos com drogas semeados e a interpretação destes crescimentos, ou seja, se a amostra é resistente ou sensível a determinada droga.

9.2.6- FICHA 6 “RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA”

Nesta ficha são anotados as culturas e os resultados dos testes bioquímicos obtidos no laboratório.

9.2.7- FICHA 7 “RESULTADO DE LEITURA DO TESTE DE CRESCIMENTO EM AGENTES INIBIDORES”

Nesta ficha serão transcritos os resultados dos testes de crescimento na presença de inibidores utilizados para identificação da espécie micobacterianas.

9.2.8- FICHA 8 “RESULTADO DOS EXAMES DO LABORATÓRIO”

Estas fichas serão utilizadas para registrar um exame ou liberar resultado, manualmente, sempre que não for possível utilizar o sistema do laboratório. Poderão ainda ser utilizadas para liberação de resultados parciais de exames, ou seja, exame ainda não totalmente concluídos.

9.2.9- FICHAS PARA PEDIDO DE EXAMES

A requisição médica é padronizada pelo LACEN. Para solicitar exame de baciloscopia e de cultura é utilizada a ficha 9 “Solicitação de Baciloscopia e de Cultura” e para identificação ou teste de sensibilidade o requisitante deverá preencher a ficha 10 “Solicitação de Identificação e/ou Teste de Sensibilidade”.

9.3- BIBLIOGRAFIA

- 1- MINISTÉRIO DA SAÚDE; Fundação Nacional de Saúde; Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária; Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Livro de Registro de Baciloscopia e de Cultura para o Diagnóstico e controle da tuberculose*. Rio de Janeiro, 2002.
- 2- MINISTÉRIO DA SAÚDE; Fundação Nacional de Saúde; Centro Nacional de Epidemiologia; Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Instruções - SILTB Sistema de Informação Laboratorial da Tuberculose*. Unidade Laboratorial. Rio de Janeiro, 2000. Versão 3.0.
- 3- MINISTÉRIO DA SAÚDE; Fundação Nacional de Saúde; Centro Nacional de Epidemiologia; Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Instruções - SILTB Sistema de Informação Laboratorial da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 2000. Versão 3.0. LACEN.

FICHA 5- LEITURA E REGISTRO DE RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE

NÚMERO		ANO																			
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA		LOTE																	
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		INH	PZA	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH										
		LJ	LJ/PZA																		
10 ³	20																				
10 ⁵	20																				
10 ⁶	20																				
Percentagem																					
Diagnóstico																					
RESPONSÁVEL PELA LEITURA												SUPERVISOR									
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA		LOTE																	
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		INH	PZA	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH										
		LJ	LJ/PZA																		
10 ³	20																				
10 ⁵	20																				
10 ⁶	20																				
Percentagem																					
Diagnóstico																					
RESPONSÁVEL PELA LEITURA												SUPERVISOR									
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA		LOTE																	
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		INH	PZA	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH										
		LJ	LJ/PZA																		
10 ³	20																				
10 ⁵	20																				
10 ⁶	20																				
Percentagem																					
Diagnóstico																					
RESPONSÁVEL PELA LEITURA												SUPERVISOR									

FICHA 6- RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

NÚMERO											
TESTES	CULTURAS										
NIACINA											
NITRATO											
CATALASE AMBIENTE											
CATALASE 68C											
TWEEN											
BETA GLICOSIDASE											
URÉIA 1											
URÉIA 2											
GELOSE											
MacCONKEY											
C F A											
TEMPO DE CRESCIMENTO											
FOTOCROMO GENICIDADE											
COR											
TELURITO DE K											
ARIL SULFATASE											
LJ CONTROLE											
LJ NaCl 5%											
INOSITOL											
MANITOL											
CITRATO DE Na											
DATA											
____ / ____ / ____											
RESPONSÁVEL											

FICHA 7- RESULTADOS DE LEITURA DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS AGENTES INIBIDORES

NÚMERO		ANO												
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA										LOTE		
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		PZA	INH	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH	OFLO ₂	CS	HX
		LJ	LJ/PZA											
10 ³	20													
10 ⁵	20													
10 ⁶	20													
Percentagem														
Diagnóstico														
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR												
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA										LOTE		
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		PZA	INH	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH	OFLO ₂	CS	HX
		LJ	LJ/PZA											
10 ³	20													
10 ⁵	20													
10 ⁶	20													
Percentagem														
Diagnóstico														
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR												
AMOSTRA Nº		DATA DA LEITURA										LOTE		
DILUIÇÃO	DIAS	CONTROLE		PZA	INH	EMB	RMP	ETH	SM	PNB	TCH	OFLO ₂	CS	HX
		LJ	LJ/PZA											
10 ³	20													
10 ⁵	20													
10 ⁶	20													
Percentagem														
Diagnóstico														
RESPONSÁVEL PELA LEITURA		SUPERVISOR												

FICHA 8- RESULTADO DOS EXAMES DO LABORATÓRIO

Nome: _____ Nº _____			
Prontuário: _____ Encaminhado por: _____			
Material: _____ Data do registro: ____ / ____ / ____			
Médico responsável: _____			
BACILOSCOPIA			
Negativa () Positiva () Contaminada () Aguardar () Não realizada ()			
CULTURA			
Negativa () Positiva () Contaminada () Aguardar () Não realizada ()			
IDENTIFICAÇÃO			
<i>M.tuberculosis</i> () M. sp. aguardar () Aguardar () Não realizada ()			
TESTE DE SENSIBILIDADE			
Direto () Indireto () Aguardar () Não realizado ()			
Isoniazida	()	Rifampicina	()
Pirazinamida	()	Etambutol	()
Etionamida	()	Estreptomicina	()
Ofloxacin	()	Amicacina	()
Rifabutina 1.0	()	Clofazimine	()
DATA			
_____ / _____ / _____			
OBSERVAÇÕES			
RESPONSÁVEL			

FICHA 9- SOLICITAÇÃO DE BACILOSCOPIA E DE CULTURA

US: _____ Município: _____ UF: _____

Nome do Paciente: _____ Nº Registro: _____

Endereço: _____ Data Nasc.: ____/____/____

Sexo: Masculino () Feminino () Material Clínico: Escarro () Outros: _____

BACILOSCOPIA

SOLICITAÇÃO DE EXAME	
<input type="checkbox"/> DIAGNÓSTICO <input type="checkbox"/> 1ª AMOSTRA <input type="checkbox"/> 2ª AMOSTRA <input type="checkbox"/> CONTROLE	
MÊS	_____
DATA	_____
RESPONSÁVEL	_____

RESULTADOS	
<input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> ++ <input type="checkbox"/> +++ <input type="checkbox"/> NÃO REALIZADO	
MÊS	_____
DATA	_____
RESPONSÁVEL	_____

CULTURA

SOLICITAÇÃO DE EXAME	
<input type="checkbox"/> DIAGNÓSTICO <input type="checkbox"/> 1ª AMOSTRA <input type="checkbox"/> 2ª AMOSTRA <input type="checkbox"/> CONTROLE	
MÊS	_____
DATA	_____
RESPONSÁVEL	_____

RESULTADOS	
<input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> ++ <input type="checkbox"/> +++ <input type="checkbox"/> CONTAMINADO <input type="checkbox"/> NÃO REALIZADO	
MÊS	_____
DATA	_____
RESPONSÁVEL	_____

OBSERVAÇÕES

FICHA 10- SOLICITAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO E/OU TESTE DE SENSIBILIDADE

I - PROCEDÊNCIA DA AMOSTRA

Instituição: _____ UF: _____

Nome do Paciente: _____

Data Nasc.: ____/____/____ Sexo: Masculino () Feminino () Profissão: _____

II - MATERIAL ENVIADO

ESPÉCIME () QUAL ? _____

CULTURA () cruzes

III - EXAME SOLICITADO

() Identificação

() Teste de Sensibilidade

() 6 drogas

() EMB, SM, INH, RMP

() OFLO, AMI

() RMP, INH, PZA

outras: _____

IV - DADOS CLÍNICOS

1. Já teve tuberculose antes: () sim () não () não sabe

Esquema	ano	cura	abandono	falência	recidiva
	()	()	()	()	()
	()	()	()	()	()

2. Outros fatores pré-disponentes para micobacterioses

· Doença pulmonar obstrutiva e/ou destrutiva:

() micose curada

() bronquite crônica

() pneumoconiose

() tuberculose curada

() doença maligna

() bronquiectasia

() silicose

· Estados de imunossupressão

HIV/AIDS: () positivo () negativo () sem informação

() doença maligna

() diabetes

() uso de drogas imunossupressoras

() outros. Especificar

· Doença esofageana com regurgitação

() sim () não

· Utilização de procedimentos invasivos:

() prótese/implante

() diálise

() transplante

() injeções e/ou punções repetidas

V - RESUMO DA DOENÇA

VI - DADOS LABORATORIAIS

Número de culturas realizadas

Número de culturas positivas

· Número de colônias nos isolamentos

1º isolamento ()+ ()++ ()+++ () número de colônias _____

2º isolamento ()+ ()++ ()+++ () número de colônias _____

3º isolamento ()+ ()+++ ()+++ () número de colônias _____

Cultura positiva com quantos dias? _____

VII - OBSERVAÇÃO

Data: ___ / ___ / ___ Responsável pelo envio _____



Capítulo 10

*SOLUÇÕES E REAGENTES.
MATERIAL DO LABORATÓRIO*

10.1- INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão descritas as formulações dos reagentes de uso comum no laboratório, que podem entrar na composição de outros reagentes descritos em capítulos anteriores. Assim como as soluções desinfetantes e anti-sépticas que podem ser utilizadas, caso o laboratório não faça uso daquelas preparações prontas fornecidas pelo comércio. Para orientar o controle de material, listamos todos os insumos utilizados pelo Laboratório.

10.2- SEGURANÇA QUÍMICA

Os reagentes descritos neste capítulo devem ser preparados em cabine de exaustão química com luvas, máscara, óculos e avental apropriado para cada um deles (ver Capítulo 1 BIOSSEGURANÇA). De modo geral, havendo contato com pele e mucosas, lavar imediatamente com água abundante. Anotar o reagente preparado nas fichas próprias e etiquetar os passos de armazenagem com a etiqueta padronizada para tal.

10.3-ÁLCOOL ETÍLICO A 70% (3)

10.3.1- SOLUÇÃO

Álcool etílico PA	77ml/70g
H ₂ O destilada qsp	23ml

10.3.1.1- Preparação

- 70 g de álcool etílico corresponde a 77 ml. Se necessitar preparar outros volumes, considerar a questão acima;
- Esta preparação deverá ser distribuída em jorradeiras de 250ml e colocadas para uso na Cabine de Segurança Biológica e nas pias;
- Anotar na Ficha 1 “Controle da Preparação do Álcool Etílico a 70%”;
- As soluções de álcool são anti-sépticas e podem ser utilizadas na desinfecção do interior das CSB.

10.4-ÁLCOOL ETÍLICO A 70% (4)

10.4.1- SOLUÇÃO

Álcool etílico comercial 95% GL/92,5 INPM	700ml
H ₂ O destilada	250ml

10.4.1.1- Preparação

- Adicionar álcool na proveta de 1000ml e completar com H₂O destilada;
- Anotar a preparação na Ficha 1 “Controle de Preparação do Álcool Etilico a 70%”;
- Distribuir em jorradeiras de 250 ml, para serem utilizadas na Cabine de Segurança Biológica (CSB) e nas pias.

10.5- SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2% (3)**10.5.1- SOLUÇÃO**

NaOCl a 5%	40ml
H ₂ O destilada qsp	100ml

10.5.1.1- Preparação

- esta solução é preparada a partir de uma solução comercial a 5%;
- juntar as duas soluções em uma proveta, misturar e distribuir para jorradeiras de 250 ml. Preparar somente no dia que vai ser utilizada, na CSB, durante as manipulações, ou em caso de acidente no laboratório;
- esta é a solução desinfetante mais recomendada para uso em laboratório de micobacteriologia;
- anotar a preparação na Ficha 2 “Controle de Preparação da Solução de Hipoclorito de Sódio a 2%”.

10.6- SOLUÇÃO DE ÁLCOOL – IODADO**10.6.1- SOLUÇÃO ESTOQUE**

Cristal de iodo	1,0g
Álcool a 70%	20ml

10.6.1.1- Preparação

- Adicionar o álcool aos poucos, homogeneizando até a dissolução dos cristais de iodo. Esta preparação deverá produzir uma solução escura e concentrada. Guardar em frasco escuro com tampa.

10.6.1.2- Solução de Uso

- adicionar a solução estoque ao álcool a 70% até alcançar a cor de chá forte. A concentração exata desta solução não é importante;
- anotar a preparação na Ficha 3 “Controle de Preparação do Álcool Iodado”.

10.7- SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO, SEGUNDO SOERENSEN (1)

10.7.1- PREPARO DAS SOLUÇÕES

10.7.1.1. Solução de Fosfato de Sódio M/15

Na_2HPO_4	9,464g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,664g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,864g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14,264g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17,64g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	48,5g
H_2O destilada q.s.p.	1000ml

- dissolver o sal na água;
- esterilizar em autoclave a 121° C por 20 minutos.

10.7.1.2- Solução de Fosfato de Potássio M/15

KH_2PO_4	9,0726g
H_2O destilada q.s.p.	1000ml

- dissolver o sal na água.
- esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos.
- anotar a preparação na Ficha 4 “Controle da Preparação do Tampão Fosfato”.

10.7.2- MONTAGEM DO TAMPÃO

Tabela 1- Montagem do tampão fosfato segundo o pH desejado.

pH	Na_2HPO_4	KH_2PO_4
6,0	12,0	88,0
6,2	18,5	81,5
6,4	26,2	73,8
6,6	36,0	64,0
6,8	50,0	50,0
7,0	61,1	38,9
7,2	72,2	28,0
7,4	80,0	20,0
7,6	87,0	13,0
7,8	91,2	8,8
8,0	95,0	5,0

10.8- ESCALA DE McFARLAND

10.8.1- PREPARO DAS SOLUÇÕES

10.8.1.1- Solução de Cloreto de Bário a 1%

Pesar 1,17g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e dissolver em água destilada completando o volume final para 100ml.

10.8.1.2- Solução de Ácido Sulfúrico a 1%

Pipetar 1ml de H_2SO_4 concentrado e adicionar sobre água destilada completando o volume final para 100ml. Ver cuidados nesta manipulação no capítulo “BIOSSEGURANÇA”.

10.8.2- PREPARAÇÃO DA ESCALA

- Tomar 10 tubos de mesmo tamanho e numerar de 1 a 10.
- Adicionar solução de cloreto de bário a 1% e solução de ácido sulfúrico a 1% (V/V) de acordo com a tabela abaixo.
- Fechar os tubos e manter na geladeira. Anotar a preparação na Ficha 5 “Controle de Preparação da Escala McFarland”.
- Quando o precipitado branco de sulfato de bário é bem agitado, cada tubo tem uma densidade diferente que corresponde aproximadamente às suspensões bacterianas referidas na tabela abaixo.

Tabela 2- Relação entre o grau de turvação indicado pela escala de McFarland e a concentração bacteriana

TUBO	BaCl_2 a 1%	H_2SO_4 a 1%	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (em milhões/ml)
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1.200
5	0,5	9,5	1.500
6	0,6	9,4	1.800
7	0,7	9,3	2.100
8	0,8	9,2	2.400
9	0,9	9,1	2.700
10	1,0	9,0	3.000

NOTA: O tubo 1/2 foi preparado diluindo-se o volume do tubo nº 1 à metade.

10.9- SOLUÇÃO DE HCL 2 N

10.9.1- CÁLCULOS

$$\begin{aligned} \text{PM} &= 36,46 \\ d &= 1,19 \\ \text{Concentração} &= 37\% \end{aligned}$$

$$\begin{array}{l} \text{Solução N} \longrightarrow 36,46 \longrightarrow 1 \text{ litro solução} \\ \text{Solução 2N} \longrightarrow X \longrightarrow 1 \text{ litro solução} \end{array}$$

$$X = \frac{36,46 \times 2}{1} = 72,92 \text{ por litro de solução}$$

$$d = \frac{m}{v} \longrightarrow v = \frac{m}{d}$$

$$v = \frac{72,92}{1,19} \longrightarrow v = 61,28 \text{ ml HCl / 1 litro solução}$$

$$61,28 \text{ ml HCl} \longrightarrow 100\%$$

$$X \longrightarrow 37\%$$

*regra de três simples e inversa

$$X = 165,62 \text{ ml de HCl p/ litro de solução a 2N}$$

10.9.2- PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HCl a 2N (200 ml)
ÁCIDO SOBRE A ÁGUA

- Juntar a 166,88ml de H₂O destilada 33,12 ml de HCl a 37%.
- Anotar a preparação na Ficha 6 “Controle da Preparação de HCl a 2N”.

10.10- UNIDADES DE MEDIDA (1)

10.11.1- MEDIDAS DE COMPRIMENTO

A unidade padrão de comprimento é o **metro**.

1000	metros	=	1 quilômetro (1km)
100	metros	=	1 hectômetro
10	metros	=	1 decâmetro
1/10	metro	=	1 decímetro
1/100	metro	=	1 centímetro (1 cm)
1/1000	metro	=	1 milímetro (1 mm)= 10^{-3} m

Angstron	(Å)	=	10^{-10} m
Nanômetro	(nm)	=	10^{-9} m
Mícron	(µm) ou micrômetro	=	10^{-6} m
Polegada	(in)	=	2,5 cm

10.10.2- MEDIDAS DE PESO

A unidade de peso é o **grama**.

1000	gramas	=	1 quilograma (1 kg)
100	gramas	=	1 hectograma
10	gramas	=	1 decagrama
1/10	grama	=	1 decigrama
1/100	grama	=	1 centigrama
1/1000	grama	=	1 miligrama (1 mg)= 10^{-3} g

dalton		=	$1,6 \times 10^{-24}$ g
picograma	(pg)	=	10^{-12} g
nanograma	(ng)	=	10^{-9} g
micrograma	(µg)	=	10^{-6} g
grão	(gr)	=	64,8 mg
onça	(oz)	=	28,3 g
libra	(lb)	=	453,6 g

10.10.3- MEDIDAS DE VOLUME

A unidade de capacidade é o **litro**.

1 litro	(l)	=	1000 mililitro
1 mililitro	(ml)	=	10^{-3}
1 microlitro	(µl)	=	10^{-6}

10.11- MATERIAL UTILIZADO NO LABORATÓRIO

A seguir serão relacionados o material de consumo e os equipamentos necessários para a realização das técnicas laboratoriais empregadas no laboratório de micobacteriologia e descritas neste manual.

10.11.1- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA

- autoclave de dupla porta;
- autoclave vertical;
- cabine de segurança biológica classe II B2/B3;
- cabine de exaustão de gases;
- cabine de manipulação “Bench Top”;
- centrífuga de rotor angular para tubos de 50ml com suporte fechado com tampa (“aerosol free”);
- chuveiro de emergência;
- extintores de incêndio de água, CO₂, pó químico;
- lava-olhos;
- pipetador automático;
- recipientes de aço inoxidável com tampa para descarte, transporte e armazenamento temporário de material contaminado.

10.11.2- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

- avental de policarbonato;
- avental de tyvek®;
- luva de borracha natural;
- luva de borracha butílica;
- luva de borracha nitrílica;
- luva de PVA;
- luva de PVC;
- luva protegida contra puncturas;
- luva de raspa de couro;
- luva para manipular objetos em baixas temperaturas;
- luva para manipular objetos em altas temperaturas;
- luva de vinil;
- óculos;
- respirador N95 ou N99;
- respirador semi-facial de silicone;
- respirador facial contra poeiras, fumos e névoas.

10.11.2- EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

- avental de policarbonato;
- avental de tyvek®;
- luva de borracha natural;
- luva de borracha butílica;
- luva de borracha nitrílica;
- luva de PVA;
- luva de PVC;
- luva protegida contra puncturas;
- luva de raspa de couro;
- luva para manipular objetos em baixas temperaturas;
- luva para manipular objetos em altas temperaturas;
- luva de vinil;
- óculos;
- respirador N95 ou N99;
- respirador semi-facial de silicone;
- respirador facial contra poeiras, fumos e névoas.

10.11.3- OUTROS EQUIPAMENTOS

- agitador de tubos, tipo vórtex;
- balança analítica;
- balança de prato superior;
- banho-maria;
- bico de Bunsen;
- câmara estufa bacteriológica;
- coagulador;
- despertador de bancada;
- dessecador;
- destilador, deionizador;
- estufa de secagem;
- freezer (-20 e - 70°C);
- geladeira;
- microscópio binocular;
- mixer;
- placa aquecedora com agitação magnética;
- potenciômetro;
- termômetros de máxima e de mínima;
- termômetro químico.

10.11.4- REAGENTES

- ácido clorídrico concentrado PA;
- ácido ortofosfórico;
- ácido paranitrobenzóico;
- ácido sulfúrico;
- ágar nutriente;
- álcool etílico comercial 95°GL/92,5 INPM;
- álcool etílico 95% PA;
- anilina incolor;
- azul de bromotimol;
- azul de metileno;
- carbonato de sódio;
- cicloserina;
- citrato de sódio;
- citrato férrico amoniacal;
- cloreto de sódio;
- dextrose;
- dihidrocloridrato de N-naftilenodiamina;
- dissulfato tripotássico de fenolftaleína;
- disco de uréia;
- estreptomicina;
- etambutol;
- etileno glicol;
- etionamida;
- fenol em cristais;
- fenolftaleína;
- fita para a prova da niacina;
- fosfato dissódico anidro e 12 H₂O;
- fosfato monopotássico anidro;
- fosfato monossódico;
- fosfato trissódico;
- frutose;
- fucsina básica;
- glicerol;
- hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico;
- hidróxido de sódio;
- hidroxilamina;
- hipoclorito de sódio a 5%;
- inositol;

- iodo metaloídico cristalizado;
- isoniazida;
- lauril sulfato de sódio;
- manitol;
- nitrato de sódio;
- ofloxacin;
- óleo de cedro;
- paraformaldeído;
- paranitrofenil-β-D-glicopiranosídeo;
- peróxido de hidrogênio a 30%;
- pirazinamida;
- piruvato de sódio;
- propileno glicol;
- rifampicina;
- sulfanilamida;
- sulfato de amônio;
- sulfato de magnésio.7 H₂O;
- tampão TRIS;
- telurito de potássio;
- tween 80;
- vermelho de fenol;
- vermelho neutro;
- xilol;
- zinco em pó.

10.11.5- MEIOS DE CULTURA

- ágar MacConkey sem cristal violeta, em pó;
- ágar nutriente, em pó;
- caldo 7H-9 de Middlebrook, em pó;
- enriquecimento ADC;
- lowenstein Jensen, em pó.

10.11.6- VIDRARIA

- balão de fundo chato, de 250 a 2.000ml.
- balão volumétrico de 10, 100, 500 e 1000ml.
- becker de 50 a 1.000ml.

- erlenmeyer de 250 a 2.000ml;
- frasco conta-gotas para corantes de 250ml;
- frasco escuro para estocar reagentes de 100 a 1.000ml;
- funil de 100 a 500ml;
- graal de porcelana com pistilo;
- kitasato de 500ml;
- lâmina de vidro para microscopia;
- pérolas de vidro;
- pipeta sorológica graduada ao décimo e ao centésimo de 1,2,5,10ml;
- proveta graduada de 100 a 2.000ml;
- tubos de ensaio com tampa de rosca 20 x 150mm, 13 x 100mm, 16x150mm.

10.11.7- OUTROS

- algodão hidrófobo;
- alça de semente bacteriológica (níquel-cromo e descartável);
- aplicador de madeira;
- caixa de madeira para guardar lâminas;
- escova para lavar tubos;
- estante de aço para portar tubos 13x100mm, 16x150mm, 20x150mm e tubos de centrífuga (de 30 e 50ml);
- espátula para pesagem de pós;
- fita adesiva para controle de autoclavagem;
- fita para medir pH (faixa de 0 a 7,0);
- gaze 8 fios tipo queijo;
- membrana filtrante tipo Millipore;
- pinça anatômica;
- potes plásticos para colheita de escarro;
- sacos plásticos para autoclavagem;
- suporte de aço para colocar lâminas;
- tubo de polipropileno com capacidade para 30 e 50ml, com tampa de rosca autoclavável.

10.11.8- DESCRIÇÃO DETALHADA DOS PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS

Para que os equipamentos do laboratório apresentem a qualidade desejada para o trabalho a que se destinam é necessário fazer uma descrição completa dos mesmos, além de certificar-se se vêm acompanhados dos catálogos descritivos, das garantias, dos certificados da Rede Brasileira de Calibração, se os fornecedores instalam. Todos esses critérios devem ser inseridos no seu pedido de compra antes da aquisição.

10.11.8.1- Cabine de Segurança Biológica

Cabine de segurança biológica classe II – B2 fornecida com instalação, com as seguintes características:

- construída em poliuretano expandido com acabamento em epóxi texturizado;
- mesa de trabalho tripartida construída em chapa de aço inox 304 de fácil remoção de limpeza e desinfecção;
- motoventilador com motor equipado com proteção térmica;
- insuflamento e exaustão - filtro HEPA, eficiência 99,99% DOP;
- área de acesso à superfície de trabalho com altura de 200mm, de acordo com a norma NSF-49;
- lâmpadas fluorescentes instaladas na parte interna do equipamento;
- nível de ruído abaixo de 67 dB;
- exaustão externa de 100% de ar filtrado;
- janela frontal, tipo basculante, confeccionada em vidro temperado com o máximo de visibilidade;
- sistema de travamento da janela blindex;
- plenuns totalmente negativados;
- intertravamento entre motoventiladores de insuflamento e exaustão.

Painel de controle:

- painel eletrônico com acionamento através de teclado tipo “Push Botton”;
- alarme visual que se ativará quando o nível de saturação dos filtros for atingido;
- lâmpada germicida;

Acessórios opcionais:

- tomada auxiliar dupla 110/220, monofásica, 5^A;
- kit para instalação (2 conexões vinílicas, 2 joelhos 90° e 3m de duto PVC);
- Área de trabalho 600cm X 1200cm X 600cm aproximadamente

10.11.8.2- Pipetador Automático

Pipetador automático, portátil, desenho ergonômico, leve e com as seguintes características:

- funções de enchimento e esvaziamento realizadas através de dois botões;
- adaptador em silicone para ajuste perfeito de pipetas sorológicas de 0,1ml até 100ml;
- válvula de retenção combinada ao filtro de membrana para proteção contra penetração de líquidos;
- com funcionamento livre do cabo e carregador;
- autonomia de 8 horas de pipetagem contínua sem recarga;
- munido de bateria recarregável;
- com suporte para fixação do pipetador na parede;
- com recarregador 110 /220v.

10.11.8.3- Microscópio Binocular

Microscópio binocular, com inclinação do tubo das oculares a 30°, com ajuste de distância entre as pupilas de 47-75 mm e rotação de 360°, oculares com amplo campo de visão com aumento de 10x (F. O. V. 20), 15x (F. O. V. 12), de construção em material sólido resistente à vibração, com pintura e tratamento antifungos para uso em ambientes quentes e úmidos. *Design* ergonômico com botão de foco e de movimento do *charriot* bem próximos em uma posição baixa, permitindo uso sem torcer os ombros, revólver com 4 objetivas planocromáticas de aumentos - 4x (A.N. 0,10), 10X (A.N. 0,25), 40X (A.N. 0,65), 100 X (imersão)(A.N.1,25). Sistema de alimentação de 110/220 V, iluminação com lâmpada de halogênio de 6V-20W, com sistema de troca de lâmpada com remoção da unidade de lente sem uso de ferramentas de forma fácil e segura, condensador Abbe (A.N. 1,25) com controle de abertura do diafragma com guia de marcação para cada tipo de objetiva de imersão. Fornecido com as 2 oculares e as 4 objetivas de imersão.

10.11.8.4- Geladeira Para Laboratório

Geladeira para laboratório, medindo: altura-2160 mm x largura-715mm x profundidade-780 mm. Gabinete externo de aço inoxidável, gabinete interno de aço inoxidável, capacidade 500 litros, prateleiras reguláveis 05 unidades, iluminação interna fluorescente 15 watts, temperatura de 2 a 8°C. Comando digital microprocessado. Alarme de máxima e mínima. Alarme de falta de energia. Sistema elétrico de segurança para uso em laboratório. Porta em perfil de alumínio anodizado com resistência interna e vidro com dupla câmara de isolamento térmica. Fechamento automático por mola de torção, vedação com borracha magnética. Degelo automático, rodízios com freio, 110/220 v.

10.11.8.5- Freezer Para Laboratório

Freezer para laboratório, medindo: altura-2160mm x largura-715mm x profundidade-780 mm. Gabinete externo de aço inoxidável, gabinete interno de aço inoxidável, capacidade 500 litros, prateleiras reguláveis 05 unidades, iluminação interna fluorescente 15 watts, temperatura -30° C. Comando digital microprocessado. Alarme de máxima e mínima. Alarme de falta de energia. Sistema elétrico de segurança para uso em laboratório. Porta em perfil de alumínio anodizado com resistência interna e vidro com dupla câmara de isolamento térmica. Fechamento automático por mola de torção, vedação com borracha magnética. Degelo automático, rodízios com freio, 110/220v.

10.11.8.6- Centrífuga de Bancada

Centrífuga de bancada, refrigerada com as seguintes características:

- velocidade máxima 5600 rpm;
- força centrífuga de 5060 x g;
- temperatura ajustável entre -5°C a temperatura ambiente;
- rotor angular com capacidade para 8 tubos de 50ml;

- 8 caçapas aerossol free;
- programa de memória para armazenar até 35 programas;
- processo de centrifugação microprocessado;
- fornecimento com instalação;
- 120 /220 v, 60 Hz;
- tempo de centrifugação ajustável entre 1 segundo a 360 minutos.

10.11.8.7- Agitador de Tubos

Agitador de tubos, tipo vórtex, design compacto, com ajuste de velocidade entre 100 e 3000rpm, base em metal resistente, opção de funcionamento contínuo e intermitente; munido de dois adaptadores de borracha reforçada sendo um para agitação de um único tubo de ensaio de 20mm de diâmetro e outro adaptador para frascos com 10 cm de diâmetro, medindo aproximadamente 15cm de comprimento por 12cm de largura, com mínimo de ruído e trepidação para trabalhar no interior de capela de segurança biológica, 120/220v.

10.11.8.8- Autoclave Dupla Porta

Autoclave dupla porta, fornecido com instalação, para esterilização em geral.

Funcionamento elétrico, a vapor ou duplo funcionamento através de:

- gerador de vapor elétrico acoplado;
- câmara interna em aço inoxidável AISI 316;
- câmara externa, porta ou portas (tipo barreira), flange(s) e gerador de vapor em aço inoxidável AISI 304;
- totalmente automático, painel com manômetro, manovacuômetro, com opções de operacionalização através de:
- boteiros de fácil manuseio com lâmpadas indicativas dos processos;
- microprocessado com ou sem impressora, necessitando apenas a programação dos parâmetros dos ciclos desejados;
- controle de temperatura digital, conjugado com impressora serial para registro de tempo e temperatura de esterilização;
- sistema hidráulico em material anti-corrosivo no segmento de alimentação, acoplado com uma bomba de alto vácuo e uma bomba de água;
- sistemas de segurança acoplados como:
- trava de segurança mecânica no eixo central da porta;
- pressostato;
- carro interno em aço inoxidável AISI 316 e carro externo facilitando o transporte dos materiais esterilizados.
- dimensões internas (mm): altura 500 x largura 500 x profundidade 1200;
- dimensões externas (mm) : altura 1880 x largura 700 x profundidade 1500;

- capacidade: 300 litros;
- potência: 21000w, 220v;
- com certificado de calibração RBC.

10.11.8.9- Bico Bunsen

Bico Bunsen elétrico, em aço inoxidável, 400W, 115V, temperatura entre 800°C a 1000°C, com chama piloto, com intensidade e altura da chama regulável para trabalho no interior de cabine de segurança biológica.

10.11.8.10- Estufa de Bancada

Estufa de bancada para incubação de 5 a 50°C, com três termostatos hidráulicos independentes para controle de segurança com painel de controle digital externo do aparelho controlado por microprocessador. Equipado com timer para alternar temperatura, 220v. Medindo aproximadamente: 66cm largura x 83cm de altura x 58 cm de profundidade.

10.11.8.11- Câmara Para Sorocoagulação

Câmara para sorocoagulação (calor úmido) - construída em gabinete especial, externamente com pintura eletrostática e seu interior totalmente revestido em aço inox AISI 304, com acabamento escovado. As prateleiras são também construídas em aço inox, com inclinação ajustável. Suportes independentes para tubos. Temperatura no interior da câmara até 85°C, gerador de umidade com nível constante. Controladores de temperatura digitais microprocessados, com sistema PID, independentes da câmara e gerador de vapor, garantindo temperatura homogênea, 220v, 700 w, 50/60 Hertz.

- painel frontal superior em policarbonato;
- controladores de temperatura digitais microprocessados independentes;
- gabinete com interior todo revestido em aço inoxidável;
- prateleiras em inox inclináveis;
- suporte independente para tubos;
- circulação interna de ar por ventoinha;
- gerador de umidade por evaporação direta;
- nível para manter o volume de água.

10.11.8.12- Sistema de Esterilização de Ar

Sistema específico de esterilização de ar para câmaras de conservação de vacinas, câmaras frias e estufas, com voltagem de 127 e 220V, estrutura interna com espelhos refletores em aço inoxidável AISI 304, sanitário, eletropolido para eliminação segura e imediata de microorganismos e odores, através de energia ultravioleta com faixa de comprimento de

ondas banda C (253,7nm), lâmpada com estrutura física em quartzo UV3s, germicida para desinfecção do ar ambiente (in door), sistema de sucção/exaustão que direciona o ar esterelizado em movimento de 360°, com controle preciso dos feixes de luz UVC, através de monitoramento microprocessado por radiômetro, fabricado de acordo com as normas da NIOSH (National Institute of Occupational Safeth and Health), para ser instalado em estufas e geladeiras.

10.12- PREVISÃO DE MATERIAL PARA COLORAÇÃO DE 1.000 LÂMINAS UTILIZANDO O MÉTODO DE ZIEHL-NEELSEN

10.12.1- SUBSTÂNCIAS

Fucsina básica	10g
Álcool etílico a 95°	10l
Azul de metileno	10g
Fenol aquoso	110ml
Ácido clorídrico	300ml
Óleo de cedro	100ml
Xilol	200ml

10.12.2- SOLUÇÕES

Fucsina básica	2l
Álcool-ácido	10l
Azul de metileno	2l

10.13- BIBLIOGRAFIA

- 1- BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. São Paulo: Ed. Melhoramentos; 1981.
- 2- BRASIL/MS/FNS/CENEP/CNPS/CRPHF. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Rio de Janeiro, 1994. 2ª ed.
- 3- BRASIL/SPS/Coordenação Nacional de DST e AIDS/ Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. *Biossegurança em Unidades hemoterápicas e laboratoriais de Saúde Pública*, Brasília.
- 4- SOMMERS, HM; GOOD, RC. "Mycobacterium". In: LENETTE, EH; BALLOWS, A; HANSLER Jr, WR; SHADOMY, HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology ;1985, p.216.

FICHA 1- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO ÁLCOOL ETÍLICO A 70%

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Álcool Etílico Comercial 95°			
Álcool Etílico PA			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Álcool Etílico Comercial 95°	
Álcool Etílico PA	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 2- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA
SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2%

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Hipoclorito de sódio a 5%			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Hipoclorito de sódio a 5%	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--

FICHA 3- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO ÁLCOOL IODADO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Álcool etílico comercial 95º			
Iodo			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE
Álcool etílico comercial 95º	
Iodo	
H ₂ O destilada	

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 4- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
KH ₂ PO ₄			
NA ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

--	--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	H ₂ O DESTILADA	VOLUME DAS SOLUÇÕES	pH
KH ₂ PO ₄				
NA ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O				
SOLUÇÃO FINAL				

--	--	--	--	--

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--	--

FICHA 5- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA ESCALA DE MacFARLAND

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
Cloreto de bário			
H ₂ SO ₄ concentrado			

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	H ₂ O DESTILADA	VOLUME DAS SOLUÇÕES
Cloreto de bário			
H ₂ SO ₄ concentrado			
Escala 1			

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

RESPONSÁVEL

FICHA 6- CONTROLE DA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HCl A 2N

DATA DE PREPARAÇÃO	QUANTIDADE PRODUZIDA	VALIDADE	Nº DE PARTIDA

--	--	--	--

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA	Nº DO LOTE	VALIDADE
HCl concentrado			

--	--	--	--

PESAGEM / VOLUME

SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE	VOLUME
HCl concentrado		
H ₂ O destilada		

CONTROLE DE QUALIDADE

APROVADO () REPROVADO ()

OBSERVAÇÕES

--	--	--	--

RESPONSÁVEL

--	--	--	--



Capítulo 11

*REDE NACIONAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE
PÚBLICA PARA VIGILÂNCIA DA TUBERCULOSE*

11.1-INTRODUÇÃO

O Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SNLSP) foi instituído através da Portaria Ministerial nº 280 de 21/07/77 e foi ratificado pela lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 19/09/90, artigo 16, que instituiu o Sistema único de Saúde - SUS. Recentemente este sistema foi reestruturado e constituído o SISLAB, um conjunto de redes nacionais de laboratórios, organizados em sub-redes por agravos ou programas, de forma hierarquizada por grau de complexidade das atividades relacionadas à vigilância epidemiológica, vigilância ambiental em saúde, vigilância sanitária e assistência médica, criada pela Portaria nº 15 de 3 de janeiro de 2002 e ratificada pela Portaria 2031 de 23 de setembro 2004. Logo a seguir, pelas Portarias nº 409 e 410 de 12 de setembro de 2002 o Centro de Referência Professor Hélio Fraga foi constituído laboratório de referência nacional para a tuberculose ratificada pela portaria nº 70 de 24 de fevereiro de 2005. A rede da tuberculose ainda terá que definir os laboratórios de referência regionais e os centros colaboradores.

11.2 - COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NACIONAL

Os laboratórios de Referências Nacional são unidade laboratoriais de excelência técnica altamente especializadas, com as seguintes competências:

- a) assessorar o gestor nacional no acompanhamento, normalização, padronização de técnicas e avaliação das atividades laboratoriais;
- b) coordenar tecnicamente a rede de vigilância laboratorial sob sua responsabilidade;
- c) realizar procedimentos laboratoriais de alta complexidade, para complementação diagnóstica e controle de qualidade analítica de toda a rede;
- d) desenvolver estudos, diagnósticos e pesquisas, de forma articulada com as sociedades técnico-científicas sem fins lucrativos e com centros de pesquisa e desenvolvimento, que reúnem competências e capacitações técnicas em áreas críticas de interesse;
- e) promover capacitação de recursos humanos em áreas de interesse ao desenvolvimento da credibilidade e confiabilidade laboratorial, estimulando parcerias com os laboratório integrantes do sistemas e com centros formadores de recursos humanos com competências específicas de interesse, visando à melhoria da qualidade do diagnóstico laboratorial;
- f) disponibilizar, periodicamente, relatórios técnicos e de gestão, aos gestores nacionais com informações relativas às atividades laboratoriais realizadas para os diferentes agravos, obedecendo cronograma definido;
- g) participar de intercâmbio e acordos nacionais e internacionais, visando, juntamente com o gestor nacional, promover a melhoria do Sistema;

11.3 - COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA REGIONAL

Os laboratórios de referência regionais são unidades laboratoriais capacitadas para desenvolver atividades mais complexas, organizadas por agravos ou programas que prestam apoio técnico-operacional àquelas unidades definidas para sua abrangência, com a competência de:

- a) assessorar, acompanhar as atividades laboratoriais executadas nas unidades;

- b) desenvolver e realizar técnicas de maior complexidade necessárias ao diagnóstico laboratorial de doenças e outros agravos à saúde, bem como dar o suporte técnico aos Laboratórios de Referência Estadual, promovendo as condições técnicas e operacionais na execução das ações;
- c) apoiar as unidades laboratoriais, realizando análises de maior complexidade, complementação de diagnóstico, controle de qualidade, capacitação de recursos humanos, bem como a supervisão e assessoria técnicas;
- d) avaliar, periodicamente, em conjunto com o Laboratório de Referência Nacional o desempenho dos laboratórios estaduais;
- e) implantar e promover os mecanismos para o controle de qualidade inter e intralaboratorial;
- f) encaminhar ao Laboratório de Referência Nacional as amostras inconclusivas, bem como aquelas para a complementação do diagnóstico e as outras destinadas ao controle de qualidade analítica;
- g) disponibilizar as informações relativas às atividades laboratoriais, por meio de relatórios periódicos, obedecendo cronograma definido.

11.4- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA ESTADUAL

Os laboratórios de Referência Estadual são os Laboratórios Centrais de Saúde Pública - LACEN, vinculados às Secretarias Estaduais de Saúde, com área geográfica de abrangência estadual, e com as seguintes competências:

- a) coordenar a rede de laboratórios públicos e privados que realizam análises de interesse em saúde pública;
- b) encaminhar ao Laboratório de Referência Regional amostras inconclusivas para a complementação de diagnóstico e aquelas destinadas ao controle de qualidade analítica;
- c) realizar controle de qualidade analítica da rede estadual;
- d) realizar procedimentos laboratoriais de maior complexidade para complementação de diagnóstico;
- e) habilitar, observada a legislação específica a ser definida pelos Gestores Nacionais das Redes, os laboratórios que estão integrados à rede estadual, informando ao gestor nacional respectivo;
- f) promover a capacitação de recursos humanos da rede de laboratórios;
- g) disponibilizar aos gestores nacionais as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas por intermédio do encaminhamento de relatórios periódicos, obedecendo cronograma definido.

11.5- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA MUNICIPAL

São unidades laboratoriais vinculadas às Secretarias Municipais de Saúde, com área geográfica de abrangência municipal e as seguintes competências:

- a) definir, organizar e coordenar a rede municipal de laboratórios;
- b) supervisionar e assessorar a rede de laboratórios;
- c) promover a capacitação de recursos humanos na rede de laboratórios;

d) habitar, observada a legislação específica a ser definida pelos Gestores Nacionais das Redes, os laboratórios que serão integrados à rede municipal, informando ao gestor estadual.

11.6- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO LOCAL

São unidades laboratoriais que integram a rede estadual ou municipal de laboratórios de saúde pública, que executam, dentre outras, as seguintes atividades:

- a) realizar análises básicos e/ou essenciais;
- b) encaminhar ao respectivo Laboratório de Referência Municipal ou Estadual as amostras inconclusivas, para complementação de diagnóstico e aquelas destinadas ao controle de qualidade analítica;
- c) disponibilizar as informações relativas às atividades laboratoriais realizadas ao Laboratório de Referência Municipal ou Estadual, por meio do encaminhamento de relatórios periódicos, obedecendo o cronograma definido.

11.7- COMPETÊNCIAS DOS CENTROS COLABORADORES

São unidades laboratoriais especializadas e capacitadas em áreas específicas que apresentam requisitos necessários para desenvolver atividades de maior complexidade, ensino e pesquisa, e têm as seguintes competências:

- a) assessorar o Gestor Nacional no acompanhamento, normatização, padronização de técnicas e avaliação das atividades laboratoriais;
- b) promover o desenvolvimento científico e tecnológico da rede, bem como a capacitação de recursos humanos;
- c) realizar procedimentos laboratoriais de alta complexidade, com vistas à complementação diagnóstica e realização de controle de qualidade analítico;
- d) desenvolver estudos e pesquisas de interesse do Gestor Nacional;
- e) disponibilizar ao Gestor Nacional informações referentes às atividades laboratoriais através do encaminhamento de relatórios periódicos.

11.8- COMPETÊNCIAS DO LABORATÓRIO DE FRONTEIRA

São unidades laboratoriais localizadas em regiões de fronteiras para viabilização do diagnóstico laboratorial de agentes etiológicos, vetores de doenças transmissíveis e outros agravos à saúde pública, bem como a promoção do controle analítico de qualidade sanitária dos serviços prestados e de produtos, e têm como competência:

- a) fortalecer as ações de vigilâncias epidemiológica, ambiental em saúde e sanitária no que se refere as ações laboratoriais em áreas de fronteiras;

- b) auxiliar nas atividades desenvolvidas pelos Laboratórios de Referência Estadual;
- c) colaborar no cumprimento dos acordos internacionais, nas áreas de prevenção e controle de doenças, produtos e serviços.

Parágrafo único. O laboratório de Fronteira, por se constituir em unidade estratégica para o país, deve reportar-se, além do gestor estadual, diretamente ao gestor nacional da rede específica.

Na definição dos Laboratórios de Fronteiras, foram considerados os seguintes aspectos:

- as estruturas laboratoriais disponíveis na região;
- os centros populacionais de maior densidade demográfica;
- áreas onde ocorrem os principais deslocamentos de pessoas e trânsito de cargas nacionais e internacionais.

11.9- REQUISITOS DE ELEGIBILIDADE PARA LABORATÓRIOS NOS DIVERSOS NÍVEIS

O crescente aumento da demanda analítica, em decorrência da evolução do processo de desenvolvimento global da economia, tem exigido respostas rápidas, maior efetividade no controle de qualidade e implantação de mecanismos que possam promover a modernização das estruturas laboratoriais. Os avanços tecnológicos ocorrem de maneira rápida e, cada vez mais colocam em disponibilidade o uso de equipamentos de automação e métodos rápidos de identificação de agentes etiológicos importantes, tornando-se imprescindível a reformulação de critérios e procedimentos, visando a melhoria do modelo existente.

Para o acompanhamento do processo de modernização e reestruturação do setor saúde é fundamental a implantação ou implementação dos sistemas de garantia da qualidade analítica nos laboratórios de saúde pública, com vistas à melhoria na prestação de serviços e eficiência no desempenho das ações relativas à vigilância em saúde. Para tanto deverão ser considerados os seguintes aspectos:

- instalações físicas;
- equipamentos e instrumentos;
- recursos humanos capacitados;
- sistemas de garantia de qualidade;
- materiais e reagentes;
- coleta, controle e transporte de amostras;
- metodologias utilizadas;
- boas práticas de laboratório;
- biossegurança;
- informatização;
- emissão de laudos;
- rotinas e fluxos.

11.10- BIBLIOGRAFIA

- 1- BRASIL. Portaria nº 15, de 3 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Diário Oficial da União, Brasília, 8 de janeiro de 2002, seção 1, p. 59.
- 2- BRASIL. Portaria nº 409, de 12 de setembro de 2002. Organiza as sub-redes de diagnóstico e vigilância laboratorial no País integrantes da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de setembro de 2002, seção 1, p. 38.
- 3- BRASIL. Portaria nº 410, de 12 de setembro de 2002. Divulga relação de órgãos/entidades que possuem laboratórios pré-selecionados para integrar a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de setembro de 2002, seção 1, p. 39.
4. BRASIL. Portaria nº 2031, de 23 de setembro de 2004. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de saúde Pública. Diário Oficial da União, Brasília 24 de setembro de 2004, Seção 1 p. 79.
5. BRASIL. Portaria nº 70, de 24 de fevereiro de 2005. Estabelece os critérios e a sistemática para habilitação de laboratórios de Referência Nacional e Regional para as Redes Nacionais de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de fevereiro de 2005. Seção 1, p. 54.



CENTRO DE REFERÊNCIA
PROFESSOR HEITOR PIMENTA

SVS

Secretaria de
Vigilância em Saúde

**MINISTÉRIO
DA SAÚDE**

