

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

Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de
Importância Médica



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

Módulo 7: Detecção e Identificação de
Micobactérias de Importância Médica

Copyright © 2013 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

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

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

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

1ª edição – 2010

Elaboração, distribuição e informações:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: www.anvisa.gov.br

Diretoria

Dirceu Brás Aparecido Barbano – Diretor-Presidente

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Adjuntos de Diretor

Luiz Roberto Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araujo de Oliveira

Doriane Patricia Ferraz de Souza

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde – GVIMS

Magda Machado de Miranda Costa

Coordenação Técnica:

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos – Anvisa

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas-SP

Redação:

Gleize Villela – Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP

Lucilaine Ferrazoli – Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP

Revisão técnica – Anvisa:

André Anderson Carvalho

Fabiana Cristina de Sousa

Heiko Thereza Santana

Magda Machado de Miranda

Suzie Marie Gomes

Cooperação técnica:

Termo de Cooperação nº 64

Organização Pan-Americana da Saúde

Organização Mundial da Saúde

Representação Brasil

Joaquín Molina – Representante

Enrique Vazquez – Coordenador da Unidade Técnica de Doenças

Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Rogério da Silva Lima – Consultor Nacional da Unidade Técnica de

Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Projeto Gráfico e Diagramação:

All Type Assessoria Editorial Ltda

Capa:

Camila Contarato Burns – Anvisa

Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

43p.: il.9 volumes

ISBN

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

SUMÁRIO

Apresentação	5
Introdução.....	7
Capítulo 1: Biossegurança	9
1.1 Procedimentos em casos de acidentes.....	10
1.2 Vigilância em saúde.....	11
1.3 Gerenciamento de resíduos	11
Capítulo 2: Coleta de Amostras	13
2.1 Amostras respiratórias	13
2.2 Urina	15
2.3 Sangue.....	15
2.4 Medula óssea, líquido, líquido pleural.....	16
2.5 Biópsias ou amostras de tecido *	16
2.6 Secreções e biópsias provenientes de infecções decorrentes de procedimentos estéticos e/ou cirúrgicos	17
Capítulo 3: Processamento de Amostras	19
3.1 Exame microscópico e coloração	19
3.2 Métodos de coloração	21
3.3 Controle e avaliação da qualidade da baciloscopia	22
3.4 Métodos para tratamento das amostras para cultura	23
Capítulo 4: Cultura para Isolamento de Micobactérias	27
4.1 Meios sólidos	27
4.2 Meios líquidos	29
4.3 Meios líquidos utilizados em métodos automatizados.....	29
Capítulo 5: Identificação de Micobactérias	33
5.1 Separação das espécies do complexo <i>M. tuberculosis</i> das MNT.....	33
5.2 Testes automatizados e moleculares para identificação.....	36
Anexos	39
ANEXO A. Indicadores para avaliação da qualidade da baciloscopia.....	39
ANEXO B. Percentual de positividade da baciloscopia no laboratório.....	41
ANEXO C. Índice de contaminação das culturas.....	41
Referências Bibliográficas	42

APRESENTAÇÃO

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

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

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

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

Introdução

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e outras denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT). Até o momento, 127 espécies e 11 subespécies estão registradas na lista de nomes bacterianos aprovados ou válidos.

O complexo *M. tuberculosis* é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose (TB) humana, *M. bovis*, que causa doença em bovinos, no homem e em vários outros mamíferos, *M. africanum*, agente etiológico da TB humana encontrado mais frequentemente na África, e *M. microti* patogênica para roedores. Recentemente, foram incluídas nesse complexo *M. caprae* e *M. pinnipedii* que causam infecção em caprinos, e em leões marinhos e no homem, respectivamente. O "*M. canettii*", uma variante de *M. tuberculosis*, ainda não foi oficialmente reconhecida como uma espécie do complexo. Essas espécies são muito similares e apresentam 99,9% de identidade genética, no entanto, apresentam diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade.

A TB é transmitida de pessoa a pessoa por aerossóis produzidos durante a expectoração. Apresenta evolução crônica e sua forma clínica é caracterizada, principalmente, pelo comprometimento dos pulmões, podendo atingir outros órgãos ou ocorrer de forma disseminada. A TB pulmonar é a mais frequente e mais importante para a saúde pública, pois é a forma que produz as partículas infectantes responsáveis pela transmissão da doença. Por essa razão, o diagnóstico precoce é fundamental para interrupção da cadeia de transmissão da doença. A baciloscopia (exame direto para pesquisa de Bacilo Álcool Ácido Resistente – BAAR) é o exame básico para o diagnóstico da TB, especialmente para a forma pulmonar. Por ser rápida e de fácil execução, permite a pronta identificação dos pacientes bacilíferos. De acordo com as normas do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), a baciloscopia deve ser realizada em 24 horas quando o paciente é atendido em ambulatórios e em 4 horas nas urgências e emergências hospitalares. A cultura é um método mais sensível e segundo as normas do PNCT deve ser realizada para: a) sintomáticos respiratórios com suspeita de TB e baciloscopia repetidamente negativa; b) casos suspeitos de TB com amostras paucibacilares e/ou dificuldades de coleta da amostra (crianças, populações indígenas); c) casos suspeitos de TB extrapulmonar; d) pacientes portadores do HIV; e) pacientes com indicação de retratamento após falência ao esquema básico, TB multirresistente (TBMR) e recidiva da doença ou reinício de tratamento após abandono; f) casos suspeitos de infecções causadas por MNT; g) casos suspeitos que vivem em instituições fechadas; h) estudos epidemiológicos como atividades de vigilância, para determinar a prevalência da resistência.

As MNT são comumente encontradas no meio ambiente, em solo e fontes de água. São classificadas de acordo com o tempo de crescimento em meio de cultura, como MNT de crescimento rápido (crescimento em menos de sete dias) e de crescimento lento (crescimento em sete dias ou mais). São também classificadas conforme sua capacidade em causar doença no homem como potencialmente patogênicas e raramente patogênicas. As espécies potencialmente patogênicas podem causar uma variedade de doenças em humanos que diferem em severidade e importância em saúde pública. Dentre as formas clínicas mais frequentes estão as infecções pulmonares, causadas por MNT de crescimento lento e rápido, e a doença disseminada em portadores do HIV, geralmente associada a MNT de crescimento lento.

Recentemente muitos casos de infecções causadas por MNT em pacientes submetidos a procedimentos invasivos têm sido descritos. Geralmente estão envolvidas as espécies de crescimento rápido como *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* e os procedimentos variam desde cirurgias estéticas, oftalmológicas e cardíacas, acupuntura, práticas de pedicuro, até o uso de medicamentos injetáveis.

O diagnóstico de doença por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento a partir de espécimes clínicos não estéreis pode significar colonização transitória ou contaminação. Assim, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica.

Por essa razão, os laboratórios precisam estar sempre atualizados. No capítulo adiante citamos alguns dos procedimentos mais utilizados para o diagnóstico das infecções por micobactérias em humanos.

Capítulo 1: Biossegurança

*Lucilaine Ferrazoli
Gleize Villela*

Os laboratórios que manipulam espécimes clínicos e/ou isolados de micobactérias devem ter normas de conduta bem estabelecidas, visando assegurar a validade e precisão nos resultados bem como a segurança de toda a equipe técnica e da comunidade. Estudos têm demonstrado que técnicos de laboratório têm um risco até cinco vezes maior de adquirir a infecção, comparado com a população geral. A principal via de infecção é aérea, através de aerossóis gerados nos procedimentos laboratoriais. Assim, as seguintes medidas devem ser adotadas:

- a) Para laboratórios que realizam apenas a baciloscopia, (laboratório nível I):
- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, aventais descartáveis e respiradores descartáveis (tipo N95/PFF2).
 - Fazer os esfregaços em cabine de segurança biológica (CSB) classe A1 ou A2, ou na bancada forrada com papel absorvente, atrás de uma chama de bico de Bunsen. No momento da preparação dos esfregaços, o laboratório deve estar com as portas fechadas e janelas semiabertas, para que não ocorram correntes de ar. Após o término do trabalho, desprezar o papel e todo resíduo em um balde para posterior autoclavação, descontaminar a bancada com hipoclorito de sódio a 2% e abrir as janelas para troca de ar do laboratório.
 - Outra opção é tratar a amostra com mesma quantidade de hipoclorito de sódio a 5% e deixar 15 minutos (a fim de inviabilizar os eventuais bacilos presentes na amostra). Centrifugar a amostra e do sedimento preparar os esfregaços em lâminas de vidro.
 - Descartar de maneira apropriada os resíduos biológicos. Todo material utilizado no preparo e os recipientes do material clínico devem ser autoclavados antes de serem descartados no lixo branco.
 - Todos os técnicos devem ter treinamento em baciloscopia e biossegurança.

- As CSB devem ser certificadas por técnico especializado pelo menos uma vez ao ano.
- b) Para laboratórios que realizam também a cultura (laboratório nível II) além das medidas já citadas, o laboratório deve:
 - Processar todas as amostras em uma CSB classe II A2.
 - Limitar a entrada de pessoas na área reservada para a manipulação dos materiais.
 - Treinar todos os profissionais nas técnicas de cultura e identificação de *M. tuberculosis*.
- c) Para laboratórios que realizam todas as técnicas descritas acima e, além disso, testes de sensibilidade às drogas (Laboratório nível III), devem possuir:
 - Uma área com ante-sala e uma sala separada onde as amostras são processadas e os testes de sensibilidade são realizados.
 - Um sistema de exaustão próprio que crie uma pressão negativa nas duas salas.
 - Uma autoclave deve ser instalada dentro dessa área para que todo material seja autoclavado antes de deixar esta área.
 - Treinamento específico dos profissionais nas técnicas de cultura, identificação e testes de sensibilidade as drogas.

1.1 Procedimentos em casos de acidentes

Para garantir a segurança no laboratório é preciso reconhecer que os acidentes podem ocorrer e formular um plano de ação para neutralizar seus eventuais efeitos prejudiciais, de maneira rápida e eficaz. Nenhum acidente deve ser considerado insignificante. Ao contrário, sempre devem ser avaliados para estudar maneiras de evitar que eles ocorram.

Os acidentes que ocorrem nos laboratórios de micobactérias podem ser divididos nos que geram um volume limitado de aerossóis e os que provocam um grande volume de aerossóis potencialmente infectados. Um volume limitado de aerossóis pode ser produzido quando ocorre quebra de um tubo contendo meio de cultura sólido ou no derramamento de uma amostra de escarro, que é viscosa e de natureza mucoide. Um grande volume de aerossóis potencialmente infecciosos pode ser produzido quando ocorre a quebra de tubos contendo cultura em meio líquido, suspensões bacterianas ou quebra de tubos durante a centrifugação.

A seguir são sugeridos dois planos de ação que podem ser utilizados em laboratórios de micobactérias, para casos de acidentes.

1.1.1 Plano de ação para um acidente que produza um volume limitado de aerossóis

- a) Cobrir o derramamento imediatamente para evitar que continuem produzindo aerossóis. Utilizar qualquer material disponível, como toalhas de papel, jornal ou o próprio avental descartável.
- b) Cobrir totalmente a área com uma solução de hipoclorito a 2%. Deixar agir por 30 min a 1 hora.
- c) Deixar o laboratório e fechar as portas. Colocar um aviso na porta indicando o acidente.
- d) Após 30 min a 1 hora, colocar EPIs (inclusive máscara) e entrar no laboratório. Recolher todos os materiais envolvidos no acidente com uma pinça ou pá e colocá-los em um recipiente com tampa, para posterior autoclavação.
- e) Limpar o local do acidente com hipoclorito a 2%.

1.1.2 Plano de ação para um acidente que produza um grande volume de aerossóis

- a) Deixar o laboratório imediatamente. Fechar a sala e se possível as entradas e saídas de ventilação com sacos plásticos. Esperar duas horas. Colocar um aviso na porta do laboratório.
- b) Após duas horas, colocar equipamentos de proteção individual (inclusive máscara) e entrar no laboratório. Cobrir o derramamento com solução de hipoclorito de sódio a 2% e deixar agir durante duas horas. Deixar o laboratório e fechar as portas.
- c) Recolher os tubos quebrados com o auxílio de uma pinça ou pá e colocá-los em um recipiente adequado para posterior autoclavação.
- d) Limpar o local do acidente com hipoclorito a 2%.

1.2 Vigilância em saúde

A vigilância em saúde dos funcionários do laboratório de TB deve ser realizada antes do funcionário começar a trabalhar no laboratório, em intervalos regulares e após um incidente de risco biológico. Os funcionários devem ser instruídos sobre os sintomas de TB e devem ter acesso imediato a serviço médico gratuito no caso de apresentarem sintomas.

1.3 Gerenciamento de resíduos

O laboratório de micobactérias produz resíduos classificados como resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de concentra-

ção, podem apresentar risco de infecção (Grupo A) e resíduos com substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública (Grupo B).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) define procedimentos para o gerenciamento de resíduos de saúde, desde a geração até a disposição final (Diário Oficial da União de 04/05/2005). Assim, cada laboratório deve elaborar seu plano de gerenciamento de resíduos compatível com sua atividade.

Por medida de segurança, todo material biológico deve ser descontaminado em autoclave antes do descarte, mesmo que tenha sido desinfetado com hipoclorito a 2%.

Capítulo 2: Coleta de Amostras

Lucilaine Ferrazoli
Gleize Villela

2.1 Amostras respiratórias

2.1.1 Escarro

COLETA	TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">• Coletar em frasco descartável estéril, transparente, capacidade 35-50 mL, de boca larga, com tampa de rosca.	<ul style="list-style-type: none">• As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, transportadas sob refrigeração e acondicionadas de forma que não haja risco de derramamento.	<ul style="list-style-type: none">• Amostras que não estiverem devidamente identificadas.	<ul style="list-style-type: none">• NALC-NaOH*• NaOH 4%• Ácido oxálico 3% (indicado para materiais contaminados com <i>P. aeruginosa</i>).
<ul style="list-style-type: none">• Identificar no corpo do frasco o nome do paciente e a data da coleta.	<ul style="list-style-type: none">• Manter as amostras em geladeira até terem sido examinadas por algum método de coloração.		
<ul style="list-style-type: none">• Orientar o paciente para coletar uma amostra proveniente da árvore brônquica. Essa amostra pode ser obtida após esforço da tosse. Evitar a coleta de saliva.			<ul style="list-style-type: none">• Meios que podem ser usados para semeadura: Lowenstein-Jensen, MGIT, MB/BacT, Ogawa.
<ul style="list-style-type: none">• O diagnóstico deve ser feito a partir de duas amostras de escarro. A primeira coletada no momento da consulta e a segunda no dia seguinte ao despertar.			
<ul style="list-style-type: none">• Durante o tratamento realizar um exame mensal.			

* Método do NALC-NaOH = N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio; ** Método de Petroff

2.1.2 Lavado brônquico (tráqueo-brônquico, broncoalveolar)

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Coletar 5 a 10 mL da amostra em tubo estéril. • A coleta de lavado brônquico induz a expectoração nos dias seguintes e por isso recomenda-se a coleta sucessiva desse material. 	<ul style="list-style-type: none"> • As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, acondicionadas de forma que não haja risco de derramamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amostras que não estiverem devidamente identificadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar a amostra em tubo cônico de 50 mL estéril com tampa de rosca. Centrifugar a 3.000 x g por 15 min. • Tratar o sedimento com NaOH 4% ou NALC-NaOH* • Meios que podem ser usados para semeadura: Lowenstein-Jensen, MGIT, MB/BacT.

2.1.3 Lavado gástrico

COLETA	TRANPORTE E ARMAZENAMENTO	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Injetar 10 a 15 mL de solução fisiológica e após 30 min coletar 50 mL da amostra em tubo estéril contendo carbonato de sódio, na proporção de 1mg/1mL de lavado gástrico. 	<ul style="list-style-type: none"> • As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, acondicionadas de forma que não haja risco de derramamento. • Manter as amostras em geladeira até serem processadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar a amostra em um tubo cônico de 50 mL estéril com tampa de rosca. Centrifugar a 3.000 x g por 15 min. • Tratar o sedimento com NaOH 4% ou NALC-NaOH*.
<ul style="list-style-type: none"> • A coleta desse material é feita em paciente hospitalizado. • Deve ser feita logo que o paciente acorda e em jejum. 	<ul style="list-style-type: none"> • Laboratório deve processar as amostras em até 4 horas após a coleta. 	<ul style="list-style-type: none"> • Meios que podem ser usados para semeadura: Lowenstein-Jensen, MGIT, MB/BacT.

* NaLC-NaOH = N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio

2.2 Urina

COLETA	TRANPORTE E ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Coletar a primeira urina da manhã, sem desprezar o primeiro jato, após assepsia genital com água e sabão. Um volume mínimo de 40 mL é o suficiente para a cultura. 	<ul style="list-style-type: none"> • As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, acondicionadas de forma que não haja risco de derramamento. • Processar a amostra o mais rápido possível, mantendo-a refrigerada até o momento da descontaminação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Urina coletada durante um período de 24 horas. O elevado número de bactérias contaminantes prejudica a descontaminação da amostra. 	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar a amostra em um tubo cônico de 50 mL estéril com tampa de rosca. Centrifugar a 3.000 x g por 15 min. • Tratar o sedimento com NaOH 4% ou NALC-NaOH*.
<ul style="list-style-type: none"> • Coletar em frasco estéril com tampa de rosca. 			<ul style="list-style-type: none"> • Meios que podem ser usados para semeadura: Lowenstein-Jensen, MGIT, MB/BacT.
<ul style="list-style-type: none"> • É recomendada a coleta de três amostras em dias consecutivos. 			

* NaLC-NaOH = N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio

2.3 Sangue

COLETA	TRANPORTE E ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Seguir as orientações de seu laboratório para a assepsia antes da coleta das amostras de sangue para cultura. • Coletar 5 mL de sangue utilizando uma seringa sem anticoagulante e inocular diretamente nos meios de cultura apropriados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não refrigerar as amostras. • Manter os frascos em temperatura ambiente até o momento da incubação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amostras colhidas com EDTA. 	<ul style="list-style-type: none"> • As amostras devem ser inoculadas diretamente no meio de cultura, conforme especificações dos fabricantes do meio utilizado. • Meios para detecção de micobactérias em amostras de sangue: Lowenstein-Jensen bifásico (uma fase sólida e com meio 7H9+ADC como fase líquida), Bactec Myco/Lytic (MB/BacT).

2.4 Medula óssea, líquido pleural

COLETA	ARMAZENAMENTO	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Coletar em tubos estéreis. • Quanto maior o volume processado maior a possibilidade de se ter uma amostra positiva. 	<ul style="list-style-type: none"> • Manter a amostra na geladeira se não for processada dentro de 12 horas. • Manter o material na geladeira após o processamento, por cinco dias. Monitorar diariamente a cultura. Caso seja detectada qualquer contaminação, proceder a descontaminação da amostra armazenada com NALC–NaOH ou NaOH 4%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Em geral essas amostras não têm bactérias contaminantes, podendo ser inoculadas diretamente nos meios de cultura. • Quando houver mais que 3 mL da amostra, centrifugar e semear o sedimento. • Meios que podem ser usados para semeadura das amostras com sangue: Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H9 + ADC, Bactec Myco Lytic, MB/BacT . • As amostras sem sangue podem ser semeadas nos meios acima e no meio MGIT.

OBS. Fezes: Não são mais utilizadas para o diagnóstico da TB intestinal. Nesse caso está indicada a biópsia.

2.5 Biópsias ou amostras de tecido *

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Coletar o material de modo asséptico e colocar em tubo estéril com um pouco de solução salina estéril. 	<ul style="list-style-type: none"> • Enviar a amostra ao laboratório o mais rápido possível, acondicionada de forma que não haja risco de derramamento. • Processar a amostra o mais rápido possível. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amostras colocadas em formol. 	<ul style="list-style-type: none"> • Macerar o material utilizando gral estéril e um pouco de salina estéril. • Tratar o material macerado com NALC–NaOH ou NaOH 4%. • Meios que podem ser usados para semeadura: Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H9 + ADC, MGIT, MB/Bact.

* Temperaturas diferentes devem ser usadas para incubar os meios inoculados com amostras de pele.

2.6 Secreções e biópsias provenientes de infecções decorrentes de procedimentos estéticos e/ou cirúrgicos

COLETA	ARMAZENAMENTO	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Coletar material de modo asséptico a partir da lesão por aspiração de material purulento ou biópsia da área infectada. Não colher material com <i>swab</i>. • Colocar o material em tubos estéreis. • Quando possível, enviar mais de uma amostra para cultura, para aumentar as chances de isolamento da bactéria. • Enviar material também para: <ul style="list-style-type: none"> • anatomo patológico para pesquisa de BAAR e granuloma. • cultura geral. • cultura para fungos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Enviar o material para o laboratório o mais rápido possível. • Manter o material na geladeira após o processamento, por 3-5 dias. Verificar diariamente se a cultura apresenta contaminação. Caso seja detectada, proceder a descontaminação com NALC ou NaOH 4%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se a lesão estiver fechada, a amostra em geral não tem bactérias contaminantes, podendo ser inoculada diretamente nos meios de cultura. • Quando houver mais que 2 mL da amostra, centrifugar e semear o sedimento. • Se a lesão estiver aberta, proceder a descontaminação com NALC ou NaOH 4%. • Placas de ágar sangue semeadas para cultura geral devem ser mantidas seladas por até sete dias a temperatura ambiente, pois muitas MNT de crescimento rápido crescem nesse meio. Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lâmina e corar pelo método de Ziehl-Neelsen. • Meios que podem ser usados para semeadura: Lowenstein-Jensen, Midlebrook 7H9+ADC, MGIT e MB/Bact.



Capítulo 3: Processamento de Amostras

Lucilaine Ferrazoli
Gleize Villela

3.1 Exame microscópico e coloração

Para todas as amostras clínicas extrapulmonares deve ser feita a baciloscopia para pesquisa de BAAR (exceto sangue e medula óssea), sendo obrigatória a realização da cultura.

Para amostras de escarro é obrigatória a baciloscopia, pois identifica com rapidez a maioria dos casos bacilíferos. Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados com o preparo do esfregaço, coloração e leitura das lâminas para garantir a qualidade do exame.

3.1.1 Preparo do esfregaço para baciloscopia do escarro:

O esfregaço pode ser preparado por meio de distensão do escarro diretamente sobre a lâmina (exame direto) ou por digestão com agentes mucolíticos seguida por centrifugação.

A) Distensão do escarro diretamente sobre a lâmina

MATERIAIS E REAGENTES	PROCEDIMENTO	CUIDADOS
<ul style="list-style-type: none"> • Papel toalha ou outro capaz de absorver respingos para forrar a bancada (delimitar a área contaminada). • Lâminas novas, com bordas foscas, sem riscos e desengoruradas. As lâminas devem ser lavadas com água e detergente neutro. Após vários enxágues, colocá-las em álcool e secá-las antes do uso. • Bandeja de inox forrada com papel absorvente (será a área de trabalho para preparar cada esfregaço). • Palitos de madeira. • Recipiente com tampa para descarte dos palitos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Organizar as amostras em ordem crescente e as respectivas lâminas em frente de cada pote. • Colocar a amostra a ser processada na bandeja de inox. • Quebrar no meio o palito e com as pontas farpadas retirar a partícula purulenta do escarro e distender na lâmina até obter um esfregaço homogêneo, ocupando 2/3 da lâmina, sem deixar espaços vazios. • Deixar a lâmina secar em temperatura ambiente, em superfície forrada com papel (área contaminada). • Descartar o material usado de acordo com as normas de biossegurança. • Guardar as amostras em geladeira até a liberação dos resultados (caso seja necessário repetir a baciloscopia ou realizar a cultura). • Fixar os esfregaços, passando três vezes pela chama do bico de Bunsen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Processar um número máximo de 12 amostras de cada vez. • Trabalhar em CSB, ou com bico de Bunsen, mantendo a chama acesa até o final do trabalho. • Esfregaços muito finos ou muito grossos dificultam a leitura e podem levar a resultados falso-negativos. • Não aquecer a lâmina durante a preparação do esfregaço, para evitar a formação de aerossóis. • Não usar alça metálica. • Mesmo após a fixação podem existir bacilos viáveis no esfregaço.

B) Digestão com agentes mucolíticos seguida por centrifugação

A técnica aumenta o risco de formação de aerossóis (torna a amostra mais liquefeita). Os procedimentos só podem ser realizados em CSB e a centrifuga deve ter rotores e adaptadores de tubos (caçapas) com tampas de proteção contra a dispersão de aerossóis.

MATERIAIS E REAGENTES	PROCEDIMENTO	CUIDADOS
<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de centrifuga de polipropileno, com tampa e fundo cônico. • Recipiente para descarte contendo hipoclorito a 2%. • Lâminas novas, com bordas foscas, sem riscos, e desengoruradas. • Solução de NaOH 4% estéril. 	<ul style="list-style-type: none"> • Transferir a amostra para o tubo de centrifuga, adicionar igual volume de NaOH a 4%, fechar bem o tubo e agitar em "vortex". • Deixar em temperatura ambiente por 15 min (fluidificação da amostra). • Adicionar água estéril e purificada por sistema de filtração, até completar 10 mL e agitar novamente. • Centrifugar a 3.000 x g por 15 min. • Desprezar o sobrenadante em recipiente à prova de respingos e agitar em "vortex" para suspender o sedimento. • Colocar 2 gotas do sedimento no centro da lâmina, preparar um esfregaço com a ponta da pipeta, com a forma de um retângulo, com dimensões de 1x2 cm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar água ultra-pura esterilizada, pois a água destilada ou deionizada pode conter BAAR e levar a um resultado falso-positivo.

3.2 Métodos de coloração

3.2.1 Ziehl-Neelsen

CORANTES	PROCEDIMENTO	RESULTADO
<ul style="list-style-type: none"> • Fucsina 0,3%: Dissolver (por agitação) 3g de fucsina básica em 100 mL de etanol 95%. Dissolver 50 g de fenol cristalizado em 1.000 mL de água destilada (aquecer suavemente até que o fenol dissolva). Misturar os 100 mL da solução de fucsina com 900 mL da solução de fenol aquoso. Deixar repousar 24 h, filtrar e manter em frasco escuro. • Álcool-ácido 3%: Adicionar 30 mL de HCl concentrado em 970 mL de etanol 95%. • Azul de Metileno 0,3%: Dissolver 3 g de azul de metileno em 100 mL de água destilada e completar o volume para 1.000 mL com água destilada. Deixar repousar 24 h, filtrar e manter em frasco escuro. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cobrir todo esfregaço com a Fucsina. Aquecer, sem deixar ferver, 3 vezes em um período de 5 min. • Lavar com água (jato fraco). • Cobrir a lâmina com álcool-ácido. • Deixar no máximo 1 min • Lavar com água (jato fraco). • Cobrir o esfregaço com azul de metileno (30 s). Lavar com água (jato fraco). • Deixar a lâmina secar ao ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina). • Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x. 	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo: bacilos corados em vermelho (BAAR), outras bactérias e células se coram em azul. • Negativo: ausência de BAAR em 100 campos observados. • Leitura da baciloscopia de escarro deve obedecer à escala semi-quantitativa, conforme item 2.3. • Leitura de baciloscopia de outras amostras deve ser informada apenas como positiva ou negativa.

3.2.2 Auramina

É indicado para ser utilizado como método de triagem, uma vez que a leitura é feita com objetiva de 40X. As lâminas positivas devem ser recoradas pelo método de Ziehl-Neelsen para confirmação do resultado e emissão do resultado em cruces.

*Um resultado negativo no exame direto do material clínico não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis*. Em casos de forte suspeita de TB realizar a cultura.

CORANTES	PROCEDIMENTO	RESULTADO
<ul style="list-style-type: none"> • Auramina fenólica: Dissolver 0,1 g de auramina O em 10 mL de etanol 90-95%. Adicionar todo o volume em uma solução de 3g de cristais de fenol em 87 mL de água destilada estéril (estocar a solução em frasco escuro). • Álcool-ácido: Adicionar 0,5 mL de HCl concentrado em 100 mL de álcool 70%. • Permanganato de potássio: Dissolver 0,5g de permanganato de potássio em 100 mL de água destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cobrir o esfregaço com auramina e deixar por 20 min. • Lavar com água (jato fraco). • Descorar com álcool-ácido por 2 min. • Lavar com água (jato fraco). • Cobrir o esfregaço com permanganato de potássio 1 min e não mais que 2 min. • Lavar com água (jato fraco). • Ler em microscópio de fluorescência com objetiva de 40x. 	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo: bacilos corados em amarelo alaranjado em fundo escuro. • Negativo: apenas campos com fundo escuro. Sem necessidade de confirmação.

3.2.3 Leitura das lâminas

Escala semi-quantitativa para informe do número de BAAR observados em esfregaços de escarro corados pelo método de Ziehl-Neelsen

Número de Bacilos (Objetiva 100x)	Resultado
• Não foram encontrados BAAR em 100 campos observados	Negativo
• Presença de 1 a 9 BAAR em 100 campos observados (relatar o número)	1 a 9 bacilos
• Presença de menos de 1 BAAR por campo em 100 campos examinados	+
• Presença de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos examinados	++
• Presença de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos examinados	+++

Utilizar um formulário quadriculado para anotar o número de bacilos encontrados em cada campo microscópico observado.

As nocardias e rodococos podem corar-se por esse método. No entanto, um técnico com experiência notará que esses micro-organismos possuem morfologias diferentes. As nocardias geralmente se coram parcialmente e são filamentosas e os rodococos são cocos.

3.3 Controle e avaliação da qualidade da baciloscopia

A) Aspectos preventivos

Os aspectos preventivos do controle de qualidade consistem de medidas adotadas desde a recepção das amostras até a emissão do laudo final, que incluem:

- Organização do local de trabalho, de maneira que facilite o trabalho, a locomoção das pessoas e a limpeza diária.
- Treinamento periódico dos profissionais, para que todos possam conhecer os procedimentos, eliminando erros decorrentes da falta de informações.
- Uso de Procedimentos Operacionais Padrão (POP). Protocolos que descrevem de forma clara e completa cada procedimento usado no laboratório, como o objetivo de padronizar as ações, para que todos os técnicos possam compreender e executar, da mesma maneira uma determinada tarefa.
- Cuidados com a identificação, conservação e transporte das amostras.
- Manutenção dos equipamentos, com instruções para utilização adequada e conservação.
- Cuidados com inspeção, identificação, preparo e armazenamento de reagentes e corantes.
- Controle de estoque periódico, visando garantir a disponibilidade de todo o material de consumo necessário e monitorar o prazo de validade dos reagentes e corantes.

B) Aspectos operacionais

Consistem na inclusão de amostras com resultado conhecido na rotina (controle de qualidade interno), uso de indicadores para avaliação da qualidade (Anexo A) e supervisão por laboratório de referência (controle de qualidade externo).

Para o controle de qualidade interno, selecionar amostras positivas e negativas para BAAR, preparar os esfregaços e fixar. Conservar as lâminas em caixas apropriadas, em lugar fresco. Identificar as caixas com data de preparo (validade de 3 meses) e símbolo de risco biológico. Incluir uma lâmina positiva e uma negativa na rotina de trabalho uma vez por semana.

3.4 Métodos para tratamento das amostras para cultura

As amostras que apresentam flora microbiana associada devem ser tratadas para eliminar os micro-organismos contaminantes, que se desenvolvem mais rápido que as micobactérias e impedem seu crescimento. O tratamento é feito com agentes químicos aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes e que também reduzem a viscosidade do material. Espécimes provenientes de cavidades fechadas, tais como os líquidos orgânicos não necessitam ser descontaminados, desde que tenham sido colhidos assepticamente e colocados em recipiente estéril.

3.4.1 N-acetil-L-cisteína/NaOH 2% (NALC-NaOH)

REAGENTES	PROCEDIMENTO
<p>Solução de NaOH 4% /Citrato de Sódio.</p> <ul style="list-style-type: none"> • NaOH 4% (40 g pastilhas de NaOH em 1.000 mL de água destilada) • Citrato de sódio 0,1M (26 g de citrato de sódio (anidro) em 1.000 mL de água destilada). • Solução de NaOH/ citrato de sódio: volume 1/1. Aliquotar em frascos com tampa de rosca e autoclavar a 121°C por 15 min. <p>Tampão fosfato 0,067 M, pH 6,8:</p> <p>Solução A</p> <ul style="list-style-type: none"> • Na₂HPO₄9,47g • Água destilada..... 1.000 mL <p>Solução B</p> <ul style="list-style-type: none"> • KH₂PO₄9,07g • Água destilada..... 1.000 mL <p>• Preparar cada uma das soluções separadamente, em seguida misturá-las em volumes iguais, acertar o pH. Aliquotar em frascos com tampa de rosca e autoclavar a 121°C por 15 min. Pode ser substituído por água estéril.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar a quantidade necessária da solução de NALC de acordo com quadro abaixo. • Colocar 2-3 mL da amostra em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 mL. Adicionar igual volume da solução de NALC. • Homogeneizar por inversão. • Deixar 15 min na estufa. • Completar até 50 mL com tampão fosfato • Centrifugar a 3.000 x g por 15 min. • Desprezar o sobrenadante em frasco contendo hipoclorito de sódio 2%, evitando ao máximo espirros do material. Limpar a borda do tubo com hipoclorito de sódio 2%. • Ressuspender o sedimento com tampão fosfato, com um volume suficiente para inocular os meios que serão utilizados. • Inocular 0,2 mL da amostra em meio sólido e 0,5 mL em meio líquido. • Preparar esfregaços em lâminas (1 x 2 cm), deixar secar na CSB antes de fixar. • Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado e descontaminar em autoclave.
MATERIAIS	
<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de centrifuga com tampa de rosca e capacidade para 50 mL (estéreis) • Pipetas Pasteur descartáveis estéreis • CSB classe II A2 • Centrifuga 	

O NALC é um potente agente mucolítico e favorece a utilização de concentrações baixas do descontaminante sem prejudicar a recuperação de micobactérias. A desvantagem é que a solução deve ser preparada diariamente porque ela perde a atividade após 24 horas.

3.4.2 Preparo da solução para tratamento das amostras com N-acetil-L-cisteína

Volume (mL)	NaOH 4% / citrato de sódio	NALC
25 mL	12,5 mL / 12,5 mL	125 mg
50 mL	25 mL / 25 mL	250 mg
100 mL	50 mL/ 50 mL	500 mg
200 mL	100 mL/ 100 mL	1g
500 mL	250 mL/ 250 mL	2,5g
1.000 mL	500mL/ 500 mL	5 g

3.4.3 NaOH 4% (Petroff)

Esta solução tem atividade descontaminante e para ter atividade mucolítica deve ser usada em concentrações altas (4%). Nessa concentração o NaOH é tóxico para algumas micobactérias, o que torna o tempo de exposição do material a esta substância crucial para se obter um bom resultado.

REAGENTES	PROCEDIMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • NaOH 4% • Dissolver 40 g de NaOH em um pouco de água. • Manter o frasco resfriado para evitar aquecimento. • Completar o volume para 1.000 mL com água destilada. Esterilizar a 121°C por 15 min. Estocar a temperatura ambiente. • Indicador Vermelho de fenol (0,4%) • Dissolver 0,4 g de vermelho de fenol em 50 mL de água destilada. Adicionar NaOH 1 N até mudar para vermelho arroxeadado, homogeneizando bem. Não adicionar mais que 7 mL. Completar com água destilada até o volume de 100 mL. Autoclavar a 121°C por 15 min. • Água destilada estéril • Solução de HCl 1N • A solução de HCl pode ser preparada com o indicador vermelho fenol, eliminando uma etapa no processo de neutralização. • Solução de HCl e vermelho fenol • Adicionar 8,5 mL de HCl (37%) a 80 mL de água destilada. Acrescentar 1,0 mL da solução de vermelho fenol e completar o volume para 100 mL com água destilada. Autoclavar a 121 °C por 15 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • Transferir a amostra deixando escorrer pela parede dos tubos de centrifuga. • Colocar o mesmo volume da solução NaOH 4% (usar uma pipeta para cada amostra). • Homogeneizar vigorosamente. • Deixar 15 min à temperatura de 37°C. • Adicionar o mesmo volume de água destilada estéril. • Gotejar a solução neutralizante até mudar a cor de rosa para amarelo âmbar. • Centrifugar a 3.000 X g por 15 minutos. • Desprezar o sobrenadante em um recipiente a prova de respingos. • Homogeneizar o sedimento . • Inocular 0,2 mL da amostra em meio sólido e 0,5 mL em meio líquido. • Preparar os esfregaços (1 x 2 cm) em lâmina • Deixar secar bem em CSB antes de fixar na chama. • Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado e descontaminar em autoclave antes de descartar no lixo branco.
MATERIAIS	
<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de centrifuga com tampa de rosca e capacidade para 50 mL (estéreis) • Pipetas Pasteur descartáveis estéreis • Estufa a 37°C e CSB classe II A2 • Centrifuga 	

3.4.4 NaOH 4% (Swab)

Este método fornece resultados similares aos obtidos no método de Petroff. Sua aplicação é indicada para amostras de escarro. É uma técnica rápida e simples, e não requer o uso de centrifuga. Também permite que um laboratório local, sem recursos de equipamentos, faça a semeadura no meio de Ogawa-Kudoh e envie ao laboratório de referência para incubação e leitura.

REAGENTES	PROCEDIMENTO
<p>Solução 4% de NaOH estéril, preparada como descrito no método de Petroff.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Impregnar um <i>swab</i> estéril com a porção mais purulenta do espécime, através de movimentos rotatórios. • Transferir o <i>swab</i> impregnado para um tubo contendo 3 mL de NaOH 4%. • Deixar em repouso por 2 min. Para descontaminação eficaz, a solução de NaOH 4% deve cobrir o algodão do <i>swab</i>. Pressionar o <i>swab</i> contra a parede do tubo para remover o excesso de NaOH. • Semear, com o próprio <i>swab</i> de maneira a distribuir o material sobre a superfície de dois tubos contendo meio Ogawa-Kudoh. É importante que o meio de cultura possua uma boa superfície (tubos medindo 18 x 160 mm ou em frascos de 30 mL). • Os esfregaços para coloração devem ser preparados como descrito no item baciloscopia direta. • Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado, autoclavar antes de descartar.
MATERIAIS	
<ul style="list-style-type: none"> • Tubos cônicos plásticos, com capacidade para 15 mL contendo \pm 3 mL da solução de NaOH 4%. • <i>Swab</i> preparado com algodão e palito de madeira e esterilizado em autoclave. 	

3.4.5 Ácido Oxálico

REAGENTES	PROCEDIMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido Oxálico 3% • Dissolver 30 g de ácido oxálico em um pouco da água destilada e completar para 1.000 mL. Esterilizar a 121°C por 15 min. Estocar a temperatura ambiente. • Indicador Vermelho de fenol • Dissolver 8 mg de vermelho de fenol em 20 mL de NaOH 4% e completar o volume para 100 mL com água destilada. • Solução de NaOH 4% • Preparada como descrito no método de Petroff. • Água destilada estéril 	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar 2 mL da amostra em um tubo cônico de 50 mL. • Colocar o mesmo volume da solução de ácido oxálico 3%. • Homogeneizar vigorosamente por 30 s. • Deixar a temperatura ambiente por 15 min, agitando o tubo ocasionalmente. • Adicionar água destilada estéril até a marca de 50 mL do frasco. • Centrifugar por 15 a 20 min a 3.000 xg e desprezar o sobrenadante. • Adicionar ao sedimento 1-2 gotas de vermelho de fenol. • Neutralizar o sedimento com NaOH 4% até obter uma cor rosa claro. • Inocular 0,2 mL da amostra no meio apropriado. • Preparar esfregaços (1 X 2 cm) em lâmina. • Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado, autoclavar antes de descartar.
MATERIAIS	
<ul style="list-style-type: none"> • Tubos cônicos com tampa de rosca e capacidade para 50 mL (descartáveis e estéreis). • CSB Classe II A2 • Centrífuga 	

É o método de escolha para processar amostras com suspeita de contaminação com *Pseudomonas aeruginosa*, como escarro de pacientes com fibrose cística.

Capítulo 4:

Cultura para Isolamento de Micobactérias

Lucilaine Ferrazoli
Gleize Villela

4.1 Meios sólidos

Lowenstein-Jensen (LJ)

a) Composição:

- Fosfato monopotássico anidro (KH_2PO_4) 4,0 g
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,4 g
- Citrato de magnésio 1,0 g
- Glicerol 20 mL
- Água destilada q.s.p. 1.000 mL
- Ovos frescos 1.600 mL
- Solução aquosa de verde malaquita a 2% ... 50 mL

b) Preparo:

- Dissolver os sais e o glicerol na água e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min. Lavar os ovos com água e sabão, enxaguar, deixar em álcool 70% por 30 min. e secar com gaze estéril. Quebrar os ovos asepticamente em recipiente estéril contendo pérolas de vidro para homogeneizar. Filtrar em gaze estéril e medir o volume. Adicionar a solução de sais e de verde malaquita e homogeneizar. Distribuir 7 mL em tubos com tampa de rosca. Coagular os meios na posição horizontal inclinada, por 50 min a 85°C.

c) Inoculação:

- 0,2 mL do material clínico tratado, em dois tubos contendo meio de LJ.

d) Incubação:

- Em estufa 37°C. O material de pele deve ser incubado a 30 e a 37°C. Manter os tubos na posição horizontal com as tampas um pouco desrosqueadas até que o inóculo esteja seco. Depois colocar na vertical e apertar as tampas.

e) Leituras:

- Examinar as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 8 semanas. Anotar o número e a pigmentação das colônias. Observar a presença de contaminantes (fungos e outras bactérias) e presença de mais de um tipo de colônias de micobactérias.
- Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lâmina de uma colônia, utilizando uma gota de água estéril. Deixar secar, fixar e corar como descrito no item baciloscopia.
- Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes.

f) Resultado:

- *Cultura negativa*: ausência de crescimento de colônias.
- *Cultura positiva para BAAR*: quando for confirmado BAAR no esfregaço em lâmina.
- *Cultura contaminada*: crescimento de outras bactérias que não micobactérias.
- *Formação de corda*: As espécies do complexo *M. tuberculosis* apresentam a formação de corda, ou grupos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grupos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.

Ogawa-Kudoh

a) Composição:

- Fosfato monopotássico anidro (KH_2PO_4) 2,0 g
- Citrato de magnésio..... 0,1 g
- Glutamato de sódio 0,5 g
- Glicerol 4 mL
- Água destilada q.s.p..... 100 mL
- Ovos frescos 200 mL
- Solução aquosa de verde malaquita a 2% 4 mL

b) Preparo:

- Dissolver os sais e o glicerol na água e ajustar o pH para 5,3 (usar NaOH 1N ou HCl 1N). Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min. Lavar os ovos com água e sabão, enxaguar, deixar em álcool a 70% por 30 min. e secar com gaze estéril. Quebrar os ovos assepticamente em recipiente estéril contendo pérolas de vidro para homogeneizar. Filtrar em gaze estéril e medir o volume. Adicionar solução de sais e de verde malaquita e homogeneizar. O pH final deve ser 6,4. Distribuir 7 mL em tubos com tampa de rosca. Coagular os meios na posição horizontal inclinada, por 50 min a 85°C.

c) Inoculação:

- Espalhar o material com o *swab* sobre a superfície do meio.

d) Incubação:

A 37°C em estufa por até oito semanas.

e) Leituras:

- Examinar as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 8 semanas. Anotar o número e a pigmentação das colônias. Observar a presença de contaminantes (fungos e outras bactérias) e presença de mais de um tipo de colônias de micobactérias. Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lâmina de uma colônia, utilizando uma gota de água estéril. Deixar secar, fixar e corar como descrito no item baciloscopia. Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes.

f) Resultado:

- Cultura negativa: ausência de crescimento. Cultura positiva para BAAR: quando for confirmado BAAR no esfregaço em lâmina. Cultura contaminada: crescimento de outros micro-organismos que não micobactérias. Formação de corda: as espécies do complexo *M. tuberculosis* apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.

4.2 Meios líquidos

Middlebrook 7H9 (adquirido comercialmente)

<p>a) Composição</p> <ul style="list-style-type: none"> • Base: sais, vitaminas, cofatores, glicerol. Enriquecimento ADC, também adquirido comercialmente. <p>b) Preparo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Seguir as orientações do fabricante para preparo da base. Adicionar a proporção de 20 mL de ADC para cada 180 mL do meio base. <p>c) Inoculação:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Semear 0,5 a 1,0 mL do sedimento tratado. <p>d) Incubação:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incubar em estufa a 37°C. Se forem inoculados fragmentos de pele no meio incubar um tubo a 37°C e outro a 30°C. 	<p>e) Leituras:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Examinar os tubos duas vezes durante as duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar oito semanas. Observar a turvação no meio. Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lâmina, utilizando uma gota da cultura. Deixar secar em cabine de segurança, fixar e corar como descrito no item baciloscopia. • Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes. <p>f) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cultura negativa: ausência de crescimento. • Cultura positiva para BAAR: quando for confirmado BAAR no esfregaço em lâmina. • Cultura contaminada: crescimento de outros micro-organismos que não micobactérias. • Formação de corda: as espécies do complexo <i>M. tuberculosis</i> apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.3 Meios líquidos utilizados em métodos automatizados

a) Composição	b) Inoculação	c) Incubação	d) Leituras
MB/BACT: Middlebrook 7H9	• 0,5 mL do material clínico tratado. Uma mistura de antibióticos deve ser adicionada previamente.	• 37°C no equipamento automatizado MB BacT/Alert por 42 dias	• Leitura automática e constante pelo aparelho.
MGIT: Middlebrook 7H9	• 0,5 mL do material tratado, adicionar 0,8 mL de OADC previamente (acompanha o kit) e PANTA (solução de antibióticos).	• Estufa a 37°C ou no equipamento BACTEC MGIT960, durante 42 dias	• Quando os tubos são incubados no equipamento, a leitura é realizada automaticamente e os tubos positivos são indicados no visor e na parte frontal da gaveta do equipamento.
BACTEC MYCO LYTIC: Middlebrook 7H9	• 5 mL de sangue	• 37°C no equipamento Bactec 9420 durante 42 dias	• Leitura automática e constante pelo aparelho. * Estes frascos são apenas para processamento de amostras de sangue.

Confirmação da presença de BAAR em culturas positivas de qualquer sistema automatizado:

Em caso de crescimento microbiano, fazer um esfregaço da cultura em lâmina, de acordo com as recomendações do fabricante, secar em CSB, fixar e corar como descrito no item baciloscopia. Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes.

Resultado

- *Cultura negativa*: ausência de crescimento
- *Cultura positiva para BAAR*: quando for confirmado BAAR no esfregaço em lâmina.
- *Cultura contaminada*: crescimento de quaisquer outros micro-organismos que não micobactérias.
- *Formação de corda*: As espécies do complexo *M. tuberculosis* apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.

Controle de qualidade

- Controle positivo: apresenta crescimento abundante no meio.
 - *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC25177 ou
 - *Mycobacterium kansasii* ATCC12478
- O controle de qualidade deve ser realizado de acordo com as especificações do fabricante.

4.3.1 Sugestão de meios de cultura, temperatura de incubação e método de processamento de diferentes amostras para isolamento de micobactérias

Amostra	Inoculação direta	Tratamento da amostra	Meio para isolamento				
			LJ	Ogawa-Kudoh	Outros	25 a 30°C	37°C
Sangue	x		x		Bactec Myco/F		x
Medula óssea	x		x		Lytic, MB/BacT		x
					7H9.		x
Líquidos assépticos	x		x		Lytic, MB/BacT, 7H9.		x
Líquor	x		x		MGIT, MB/BacT, 7H9.		x
Amostras respiratórias		x	x	x	MGIT, MB/BacT, Ogawa.		x
Lavado gástrico		x	x		Kudoh, MGIT, MB/BacT.		x
Secreções e biópsias		x	x		MGIT, MB/BacT.		x
Secreções e biópsias cutâneas		x	x		MGIT, MB/BacT.	x	x
Urina		x	x		MGIT, MB/BacT, suplementado com hemina.		x
Linfonodo		x	x		MGIT, MB/BacT.		x



Capítulo 5: Identificação de Micobactérias

Lucilaine Ferrazoli
Gleize Villela

Os testes de identificação de micobactérias deverão ser realizados em CSB, classe II, A2. O técnico deverá utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs), como máscara (N95), luvas e avental.

Os laboratórios que fazem cultura para micobactérias devem realizar pelo menos a separação das espécies do complexo *M. tuberculosis* das MNT, do contrário deverão reportar o resultado das culturas positivas como *Mycobacterium* sp.

A identificação das MNT pode ser feita por métodos fenotípicos, moleculares ou pela combinação de ambos. Entretanto, devido ao aumento no número de espécies descritas, recomenda-se que os isolados de MNT sejam encaminhados a um Laboratório de Referência da região de abrangência do laboratório para identificação.

5.1 Separação das espécies do complexo *M. tuberculosis* das MNT

A separação das espécies do complexo *M. tuberculosis* das MNT pode ser feita por quatro testes fenotípicos:

- a) Análise microscópica da cultura
- b) Análise macroscópica da cultura
- c) Inibição de crescimento em meio de LJ contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB)
- d) Teste da niacina

A) Análise microscópica da cultura

A análise microscópica consiste na confecção de um esfregaço em lâmina a partir de uma colônia, corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Permite avaliar a pureza da cultura, confirmar presença de BAAR e a formação de corda. De modo geral, as micobactérias apresentam-se na forma de bacilos curvos ou retos. As espécies do complexo *M. tuberculosis* apresentam um arranjo característico dos bacilos em cadeias lineares paralelas (ou cordões de bacilos) denominado corda. A formação de corda é mais evidente em meio líquido, mas também pode ser observada em esfregaços obtidos de cultura em meio sólido.

A maioria das MNT não forma corda, apresentando aspecto microscópico de bacilos isolados, com exceção de algumas espécies como *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*.

B) Análise macroscópica da cultura

Esta avaliação é feita na cultura original em meio sólido. As colônias de micobactérias cultivadas em meio sólido apresentam diferentes morfologias e pigmentação. A morfologia das colônias pode ser lisa, rugosa, opaca ou transparente. A pigmentação é, também, uma característica importante utilizada na classificação e pode variar de laranja a amarelo intenso.

<p>a) Materiais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lupa <p>b) Procedimento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Observar a cultura de preferência com uma lupa manual em um ambiente iluminado e anotar as características da colônia. • Observar e anotar o aspecto da colônia: lisa, rugosa, aspecto de couve-flor. • Observar e anotar a pigmentação da colônia: acromógena (creme), pigmentada (laranja, amarela, salmão). 	<p>c) Resultado</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Colônia de M. tuberculosis</i>: colônia rugosa com aspecto de couve-flor, acromógena, geralmente de cor creme. • <i>Colônia de MNT</i>: pigmentada ou acromógena, lisa ou rugosa.
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

C) Teste da inibição do crescimento em PNB (ácido p-nitrobenzóico)

Separa as espécies do complexo *M. tuberculosis* que são inibidas das demais micobactérias que crescem neste meio.

<p>a) Reagentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Meio LJ contendo 500 µg/mL de ácido p-nitrobenzóico <p>Solução estoque de PNB (25 mg/mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dissolver 2,5 g de PNB em 15 mL de solução NaOH 1N. Completar com água destilada estéril até 80 mL. Acrescentar uma ou duas gotas de solução de fenolftaleína 0,1% (solução em etanol). Acrescentar, gota a gota, cerca de 3 mL de uma solução de HCl 1 N, até ficar incolor. Se houver precipitação, é devido ao excesso de ácido; acrescentar mais um pouco de NaOH. Completar com água destilada estéril até 100 mL. Distribuir 5 mL em criotubos estéreis e manter a -20°C. Validade: três meses. <p>Meio de LJ contendo 500 µg/mL de PNB</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 4 mL da solução estoque de PNB 25 mg/mL em 200 mL do meio de LJ antes da coagulação. Distribuir 3 mL de meio em tubos 12 x 120 mm. Coagular o meio, colocando os tubos inclinados, a 85°C por 45 min. Incubar a 36°C ± 1°C por 24 h para a prova de esterilidade. Validade: 3 meses. <p>b) Materiais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alça descartável estéril • Estufa 37°C • Pipeta Pasteur descartável estéril • Frascos de 3-5mL com tampa de rosca contendo 1,0 mL de água destilada e pérolas de vidro estéreis. 	<p>C) Procedimento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transferir uma alçada (não muito cheia) do crescimento bacteriano para o frasco com água destilada e pérolas de vidro e homogeneizar. Deixar em repouso por 10 a 15 min. Inocular 0,2 mL da suspensão com a pipeta Pasteur no tubo de LJ contendo PNB e no tubo LJ controle. Incubar a 37°C. <p>d) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Positivo</i>: crescimento • <i>Negativo</i>: sem crescimento <p>e) Controle de qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Positivo</i>: MNT • <i>Negativo</i>: complexo <i>M. tuberculosis</i>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

D) Teste de produção de niacina

Todas as micobactérias produzem niacina (precursor das coenzimas NAD e NADP), mas algumas espécies têm um bloqueio na via metabólica do NAD que faz com que a niacina seja acumulada e excretada no meio de cultura.

<p>a) Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fitas para o teste da niacina, disponíveis comercialmente. <p>b) Materiais e equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alça descartável estéril • Estufa 37°C • Pipeta pasteur descartável estéril • Tubo de rosca 12x120 mm estéril • Água destilada estéril <p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Seguir as instruções fornecidas pelo fabricante. 	<p>d) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Positivo</i>: cor amarela no líquido • <i>Negativo</i>: não ocorre mudança de cor <p>e) Controle de Qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Positivo</i>: <i>M. tuberculosis</i> • <i>Negativo</i>: complexo <i>M. avium</i>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

5.1.1 Separação do complexo *M. tuberculosis* das MNT

Características	complexo <i>M. tuberculosis</i>	MNT
Pigmentação	ausente	presente/ausente
Formação de corda	+	-
Crescimento em LJ-PNB	-	+
Produção de niacina	+	+/-

-/+ = predominantemente negativo; PNB = ácido p-nitrobenzóico.

5.2 Testes automatizados e moleculares para identificação

5.2.1 Identificação por sondas de ácidos nucleicos

As sondas de DNA utilizam uma fita simples de DNA marcada com um éster de acridina complementar ao rRNA do micro-organismo alvo. Após a lise das células da micobactéria, o rRNA é liberado e a sonda marcada se combina com esse rRNA formando um complexo sonda + rRNA.

Uma solução hidrolítica é utilizada para inativar o éster não ligado ao rRNA. O complexo formado é detectado por quimioluminescência com um luminômetro. A quantidade de luz produzida é proporcional a quantidade de complexos sonda + rRNA presentes na amostra.

As sondas disponíveis comercialmente identificam o complexo *M. tuberculosis*, complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae* e *M. intracellulare* (GenProbe Inc. San Diego, CA).

Identificação por sondas de ácidos nucleicos

a) Materiais e Equipamentos

- Luminômetro
- Sonicador de banho maria
- Banho seco 95°C
- Seringa de tuberculina
- Pipetas automáticas de 100µl e 300µl
- Banho 60°C

b) Procedimento

1. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio líquido.

- Utilizar a cultura quando o crescimento atingir a escala 1 ou superior de McFarland.
- Adicionar 100 µl do reagente 1 e 100µl do reagente 2 em um tubo de lise.
- Ligar todos os banhos para que possam atingir a temperatura adequada antes de começar o teste.
- Retirar 1 mL do crescimento bacteriano e colocar no tubo de lise.
- Agitar o tubo vigorosamente por 5 min.
- Sonicar por 15 min. à temperatura ambiente.
- Colocar o tubo no banho a 95°C por 15 min.
- Deixar o tubo esfriar a temperatura ambiente.
- Retirar 100 µl do lisado e transferir para um tubo com a sonda.
- Incubar 15 min a 60°C.
- Pipetar 300 µl do reagente 3 (que vem no kit) no tubo.
- Tampar e misturar no “vortex”.
- Colocar no banho a 60°C * por 5 min.
- Retirar do banho, deixar chegar a temperatura ambiente e colocar no luminômetro para fazer a leitura.

* A temperatura do banho de 60°C é crucial para ocorrer o anelamento da sonda com o rRNA da amostra.

2. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio sólido:

- Colocar 100µl do reagente 1 e 100µl do reagente 2 no tubo de lise
- Inocular uma alçada cheia do crescimento no tubo de lise.
- Proceder como descrito acima no item 1

3. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio líquido:

- Somente fazer o teste quando o caldo apresentar uma boa turvação. Colocar 100 µl do reagente 1 e 100 µl do reagente 2 no tubo de lise
- Colocar 1 mL da amostra no tubo de lise
- Proceder como descrito acima no item 1.
- Nota: O passo mais importante no processo é a lise das células. Após colocar a amostra no tubo de lise, agitar no “vortex” vigorosamente por aproximadamente 5 min para que o processo seja adequado.

c) Resultado

- Positivo: > 30,000 RLU (Relative Light Units)
- Negativo: < 30,000 RLU
- A sonda para o complexo *M. tuberculosis* não identifica as diferentes espécies de micobactérias pertencentes ao complexo.

5.2.2 Identificação por métodos de amplificação do DNA

Vários são os métodos para amplificação do DNA de micobactérias que existem no mercado. No entanto, apenas alguns possuem a aprovação do FDA (Food and Drugs Administration, EUA) para serem utilizados em amostras pulmonares com baciloscopia positiva; a exemplo do Amplicor e Cobas-Amplicor (Roche Molecular Systems Branchburg, NJ) e AMTD e EMTD – nova geração do AMTD (Gen Probe Inc., San Diego, CA). Este último aprovado para uso em amostras com baciloscopia negativa. Esses testes foram aprovados apenas para uso rotineiro na suspeita clínica de TB pulmonar em pacientes adultos, não infectados pelo HIV e sem tratamento prévio nos 10 meses que antecedem o evento atual.

O CDC (Center for Disease Control, EUA) recomenda a seguinte interpretação para esses testes:

- a) Baciloscopia positiva e PCR positiva, confirmação do caso de TB.
- b) Baciloscopia positiva e PCR negativa, avaliação de inibidores da reação de PCR na amostra analisada. Se não forem encontrados inibidores, suspeitar de infecção por uma MNT.
- c) Baciloscopia negativa e PCR positiva analisar nova amostra, caso a nova amostra seja positiva, o caso é confirmado.
- d) Baciloscopia negativa e PCR negativa, analisar nova amostra.

É importante ressaltar que esses testes são caros e não se aplicam para monitoramento do tratamento, nem substituem a cultura.

O procedimento técnico para a realização desses métodos deve seguir rigorosamente as instruções do fabricante.

5.2.3 Resumo dos métodos:

	PCR (Amplicor, Roche Diag. Systems)	AMTD (Gen Probe)
Princípio	<ul style="list-style-type: none"> • É um sistema semi-automático de amplificação do DNA por uma série de incubações sucessivas em diferentes temperaturas usando uma enzima estável a temperatura e dependente de DNA (Taq polimerase). 	<ul style="list-style-type: none"> • É um sistema semi-automático de amplificação de RNA que utiliza uma única temperatura de amplificação e duas enzimas, uma que converte o rRNA em DNA e outra que transcreve o DNA em RNA.
Materiais e Equipamentos	<ul style="list-style-type: none"> • kit Amplicor • termociclador • pipetas automáticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit AMTD • pipetas automáticas • sonificador • banho 42°C • banho seco 95°C • banho 60°C • luminômetro
Procedimento	<p>Tratar a amostra pelo método de NALC-NaOH. Utilizando os reagentes do kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • extrair o DNA das micobactérias; • purificar e concentrar o DNA extraído; • amplificar o DNA purificado e concentrado; • detectar o produto amplificado com sondas específicas, marcadas com digoxigenina e biotina no formato de uma reação imunoenzimática colorimétrica. 	<p>Tratar a amostra pelo método de NALC-NaOH. Utilizando os reagentes do kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • extrair o DNA das micobactérias; • purificar e concentrar o DNA extraído; • amplificar o DNA purificado e concentrado; • detectar o produto amplificado com sondas específicas marcadas com um éster de acridina. Fazer a leitura no luminômetro.

Anexos

ANEXO A. Indicadores para avaliação da qualidade da baciloscopia

Indicador 1. Percentual de baciloscopias liberadas após 24 horas da recepção da amostra, no período em avaliação

Uso: avaliar a resposta do laboratório em relação à realização da baciloscopia e liberação de resultados em tempo ideal (máximo 24 h)

Período de avaliação: semestral

Fonte de dados: livro de Registro de Baciloscopia para Diagnóstico e Controle da TB

Parâmetro de avaliação e interpretação: percentual deve ser \leq a 15% (adequado)

Método de cálculo:

$$\frac{\text{Nº de resultados liberados após 24h da recepção das amostras em determinado período}}{\text{Nº total de baciloscopias liberadas no mesmo período}} \times 100$$

Indicador 2. Percentual de amostras para diagnóstico com aspecto de saliva, no período em avaliação

Uso: avaliar a qualidade das amostras recebidas para diagnóstico e necessidade de treinamento/reciclagem do técnico que orienta o paciente para a coleta

Período de avaliação: semestral

Fonte de dados: livro de registro de baciloscopia

Parâmetro de avaliação/interpretação: percentual deve ser \leq a 15% (adequado)

Método de cálculo:

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

Indicador 3. Percentual de lâminas com esfregaço inadequado, no período de avaliação

Uso: avaliar a necessidade de treinamento/reciclagem do técnico que prepara os esfregaços

Período de avaliação: trimestral ou estabelecido pelo laboratório.

Fonte de dados: observação macroscópica do esfregaço pela equipe técnica do laboratório ou relatório do CQE* realizado pelo laboratório de referência.

Parâmetro de avaliação/interpretação: percentual deve ser \leq a 10% (adequado)

Método de cálculo:

$$\frac{\text{Nº de esfregaços considerados inadequados em determinado período}}{\text{Nº total de esfregaços realizados no mesmo período}} \times 100$$

*CQE= Controle de Qualidade Externo

Indicador 4. Percentual de lâminas com coloração inadequada, no período em avaliação

Uso: avaliar a necessidade de treinamento do técnico que realiza a coloração dos esfregaços

Período de avaliação: determinado pelo laboratório ou sempre que chegar o relatório do CQE.

Fonte de dados: observação macroscópica do esfregaço pela equipe técnica do laboratório ou relatório do CQE* realizado pelo laboratório de referência.

Parâmetro de avaliação/interpretação: percentual deve ser ≤ a 10% (adequado)

Método de cálculo:

$$\frac{\text{Nº de lâminas com coloração inadequada em determinado período}}{\text{Nº total de lâminas realizadas no mesmo período}} \times 100$$

*CQE= Controle de Qualidade Externo

Indicador 5. Percentual de lâminas para diagnóstico submetidas ao CQE com discordância qualitativa na leitura, no período em avaliação.

Uso: avaliar a confiabilidade dos resultados da baciloscopia e necessidade de treinamento do técnico responsável.

Período de avaliação: sempre que chegar o relatório do CQE*.

Fonte de dados: relatório do CQE realizado pelo laboratório de referência.

Parâmetro de avaliação/interpretação: um percentual de lâminas acima de 1,0% com resultado falso positivo leva a diagnóstico errado e ao uso inadequado de medicamentos; um percentual de lâminas acima de 0,5% com resultado falso negativo acarreta a não identificação das fontes de infecção.

Método de cálculo:

$$\begin{aligned} & \text{Lâminas com resultado falso positivo:} \\ & \frac{\text{Nº total de lâminas submetidas ao CQE com resultado falso positivo no período}}{\text{Total de lâminas positivas submetidas ao CQE no mesmo período}} \times 100 \\ & \text{Lâminas com resultado falso negativo:} \\ & \frac{\text{Nº total de lâminas submetidas ao CQE com resultado falso negativo no período}}{\text{Total de lâminas negativas submetidas ao CQE no mesmo período}} \times 100 \end{aligned}$$

*CQE= Controle de Qualidade Externo

ANEXO B. Percentual de positividade da baciloscopia no laboratório

Indicador 1. Percentual de positividade da baciloscopia

Fonte: livro do laboratório

Período de avaliação: mensal

Método de cálculo:

$$\frac{\text{Nº de baciloscopias positivas de diagnóstico no período}}{\text{Nº total de baciloscopias de diagnóstico examinadas}} \times 100$$

ANEXO C . Índice de contaminação das culturas

Indicador 1. Percentual de contaminação das culturas

Período de avaliação: mês

Parâmetro de avaliação: 3-5% adequado.

Índice menor indica que o tratamento para descontaminação está sendo muito drástico.

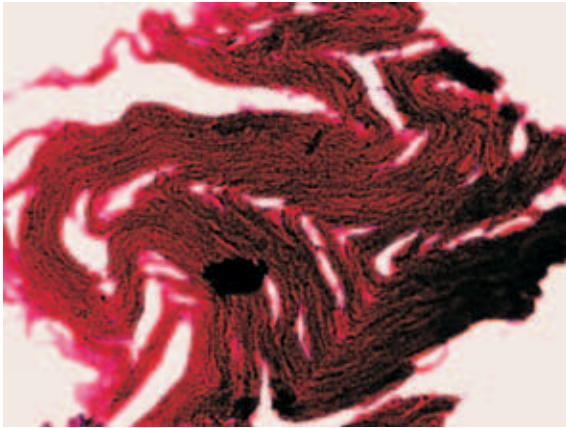
Método de cálculo:

$$\frac{\text{Nº de culturas contaminadas no período}}{\text{Nº total de culturas no período}} \times 100$$

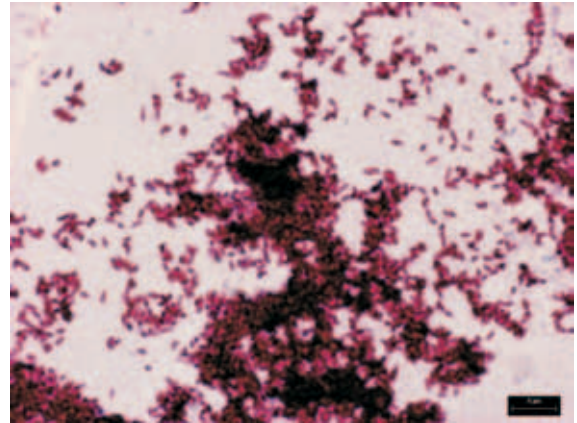
Referências Bibliográficas

- BRASIL. Resolução CONAMA n. 358 de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, n. 84, p 63-5, de 04 de maio de 2005, Seção 1.
- COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice. Butter Worth-Heinemann, Oxford, 2nd edition. 1997.
- CVE/SES-SP. Orientações para investigação clínica e tratamento de infecções por Mycobacterium spp. em procedimentos estéticos. Disponível em (http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/ih/ih_saude.html). Acesso em 19 de abril de 2013.
- EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>). Acesso em 19 de abril de 2013.
- HALL, L.; ROBERTS, G.D. Non-molecular identification of nontuberculous micobactéria in the clinical microbiology laboratory: what's the real deal? Clinical Microbiology Newsletter, 28:73-80, 2006.
- KENT, P.T. ; KUBICA G.P. Public Health Mycobacteriology. A guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta, 1985.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, A.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. Mycobacteria. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott, Philadelphia, 5ª ed, 1997.
- MONTEIRO, P.H.T.; MARTINS, M.C.; UEKI, S.Y.M.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; TELLES, M.A.S. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex. Brazilian Journal of Microbiology, 34:171-174, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3a ed. Edição comemorativa. Rio de Janeiro. 2005. MS/SVS/DVE-Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1ª edição. Brasília, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose-Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Série TELELAB, Brasília, 2001.
- WAGNER D, YOUNG LS. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. Infection, 32: 257-70, 2004.
- WHO. Laboratory Services in Tuberculosis Control: Part I Organization and Management. Geneva, 1998.

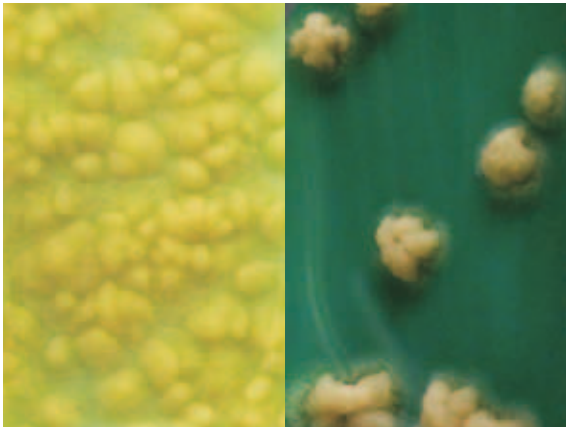
Figuras



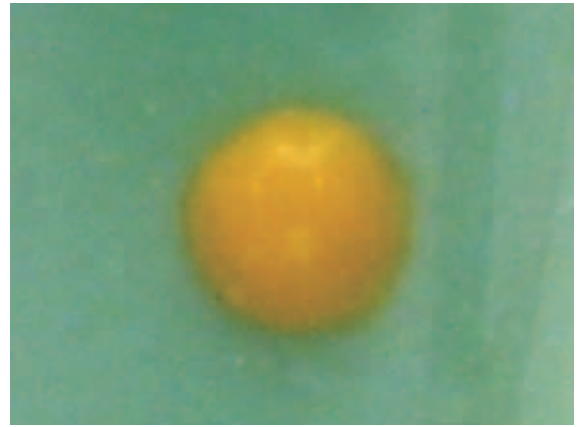
Formação de corda em esfregaço de cultura de *M. tuberculosis* corado pela técnica de Ziehl-Neelsen.



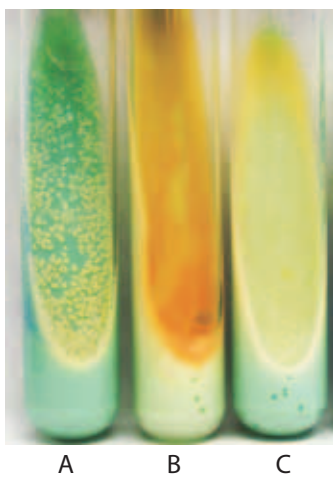
Aspecto microscópico de MNT em esfregaço de cultura corado pela técnica de Ziehl-Neelsen.



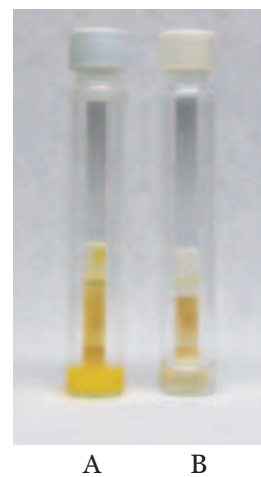
Aspecto macroscópico de colônias de *Mycobacterium tuberculosis*



Aspecto macroscópico de colônia de MNT



Cultura de micobactérias em meio Lowenstein-Jensen.
A) *Mycobacterium tuberculosis*; B e C) MNT



Teste da niacina.
A) teste positivo;
B) teste negativo.



**Acesse o site
da ANVISA**

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

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

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