



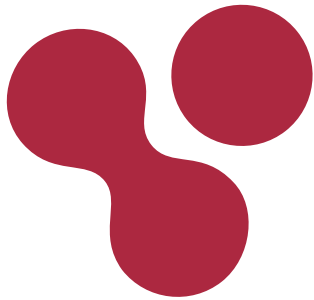
## Termo de Cooperação n° 37

Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde



**Ministério  
da Saúde**





Tecnologia em serviços de saúde

# Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos

MARÇO - 2006

OPAS/ANVISA/SVS

# Projeto de “Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”

## **Coordenação do Projeto**

Flávia Freitas de Paula Lopes – GGTES/ANVISA/MS  
Adélia Aparecida Marçal dos Santos – GIPEA/GGTES/ANVISA/MS  
Maria Cândida de Souza Dantas – CGLAB/SVS/MS  
Valeska de Andrade Stempliuk – OPAS/OMS

## **Elaboração**

Valeska de Andrade Stempliuk – OPAS/OMS

## **Colaboradores**

Adélia Aparecida Marçal dos Santos – GIPEA/GGTES/ANVISA/MS  
Antonia Maria Machado - Laboratório Central do Hospital São Paulo - UNIFESP  
Eliete Frigatto - Laboratório Central do Hospital São Paulo - UNIFESP  
Heiko Thereza Santana - GIPEA/GGTES/ANVISA/MS  
Janaína Sallas – Coordenação Geral Laboratórios de Saúde Pública – DEVEP/CGLAB/SVS/MS  
Márcia de Souza Carvalho Melhem – Instituto Adolfo Lutz / São Paulo SP  
Maria Rita Elmor – Laboratório de Microbiologia do Hospital Sírio Libanês / São Paulo SP  
Marinês Dalla Valle Martino – Hospital Israelita Albert Einstein / São Paulo SP  
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

## **Revisão técnica**

Heiko Thereza Santana – GIPEA/GGTES/ANVISA/MS  
Janaína Sallas – DEVEP/CGLAB/SVS/MS  
Sílvia Figueiredo Costa – Hospital das Clínicas – FM/USP  
Suzie Marie Gomes – GIPEA/GGTES/ANVISA/MS  
Valeska de Andrade Stempliuk – OPAS/OMS

## **Revisão de texto**

Ana Beatriz de Noronha

Esta publicação está sendo realizada no marco do Termo de Cooperação 37 (TC 37) entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Ministério de Saúde e a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde - Representação do Brasil.

Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde  
Setor de Embaixadas Norte, Lote 19, 70800-400 Brasília-DF  
[Postmaster@bra.ops-oms.org](mailto:Postmaster@bra.ops-oms.org)  
[www.opas.org.br](http://www.opas.org.br)

Impresso no Brasil

# Lista de Figuras

**Figura 1**

Propagação da cultura de Bactérias

M2 - I - 4

**Figura 2**

Fluxograma para manuseio e estocagem da Cepa de Referência

M2 - C1 - 2

**Figura 3**

Fluxograma para manuseio da Cepa de Referência no controle da qualidade

M2 - C1 - 3

## Lista de Siglas e Abreviaturas

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BaSO <sub>4</sub>	Sulfato de Bário
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIQ	Controle Interno da Qualidade
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CQ	Controle da Qualidade
CQIL	Controle da Qualidade dos Insumos Laboratoriais
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
EPC	Equipamentos de Proteção Coletiva
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
ESBL	Beta-lactamase de Espectro Estendido
FM/USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GGTES	Gerência-Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde
GIPEA	Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
ISO	<i>Internacional Standards Organization</i>
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCIQ	Programa de Controle Interno da Qualidade
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SPVA	Sucrose Fosfato Glutamato
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
TSB	Caldo de Soja Tríptica
UNIFESP	Universidade Federal Escola Paulista

# Sumário

## Introdução

	M2 - I - 1
1. Parâmetros para um Programa de Controle da Qualidade	M2 - I - 1
I - Fase pré-analítica	M2 - I - 1
II - Fase analítica	M2 - I - 2
III - Fase pós-analítica	M2 - I - 4
2. Cepas de referência	M2 - I - 4
2.1. Definições	M2 - I - 4
2.2. Tabela 1. Indicação de uso das cepas de referência	M2 - I - 5

## Capítulo 1

### Controle da qualidade em testes de sensibilidade para Bacteriologia

	M2 - C1 - 1
1. Cepas de referência	M2 - C1 - 1
1.1. Manuseio e estocagem	M2 - C1 - 1
2. Controle de Turbidez para a Preparo do Inóculo	M2 - C1 - 4
3. Método de Disco-Difusão	M2 - C1 - 4
3.1. Frequência dos testes de controle da qualidade	M2 - C1 - 4
3.2. Teste de controle da qualidade dos meios de cultura	M2 - C1 - 5
3.3. Testes de controle da qualidade da prova e do perfil de sensibilidade	M2 - C1 - 6
4. Método de Diluição em Caldo ou Ágar (CIM)	M2 - C1 - 8
4.1. Frequência dos testes de controle da qualidade	M2 - C1 - 9
4.2. Frequência dos testes de controle da qualidade para testes de triagem	M2 - C1 - 9
4.3. Testes de controle da qualidade do meio de cultura	M2 - C1 - 9
4.4. Método de diluição em ágar	M2 - C1 - 9
4.5. Método de diluição em caldo (microdiluição e macrodiluição)	M2 - C1 - 10
4.6. Testes de controle da qualidade da prova e do perfil de sensibilidade	M2 - C1 - 10

## Capítulo 2

### Controle da qualidade em testes de sensibilidade para Leveduras

	M2 - C2 - 1
1. Cepas de Referência	M2 - C2 - 1
1.1. Cepas recomendadas para testes de CIM de 48 horas por diluição em caldo	M2 - C2 - 1
1.2. Cepas recomendadas para testes de CIM de 24 e 48 horas por microdiluição em caldo	M2 - C2 - 1
1.3. Cepas recomendadas para disco-difusão	M2 - C2 - 1
2. Manuseio e estocagem das cepas de referência	M2 - C2 - 1
2.1. Preparo das cepas de referência para armazenamento	M2 - C2 - 1
2.2. Armazenamento das cepas de referência	M2 - C2 - 2
2.3. Manuseio das cepas de referência nos testes de rotina	M2 - C2 - 2

3. Freqüência dos Testes de Controle da Qualidade	M2 - C2 - 3
3.1. Intervalos de CIM	M2 - C2 - 3
3.2. Testes de sensibilidade a antifúngicos	M2 - C2 - 3
4. Testes de controle da qualidade do Meio de Cultura e Artigos de Plástico	M2 - C2 - 4
5. Outros Testes de Controle utilizados na microdiluição e microdiluição	M2 - C2 - 5
5.1. Controle do crescimento	M2 - C2 - 5
5.2. Controle de pureza	M2 - C2 - 5
5.3. Controle da leitura dos pontos finais da reação	M2 - C2 - 5
6. Teste de qualidade da prova e do perfil de sensibilidade	M2 - C2 - 5

### Capítulo 3

#### Controle da qualidade em testes de sensibilidade realizado por Métodos Automatizados

1. Elementos essenciais do sistema de gestão da qualidade	M2 - C3 - 1
1.1 Fase pré-analítica	M2 - C3 - 1
1.2. Controle interno do laboratório	M2 - C3 - 1
1.3. Controle da qualidade dos processos automatizados	M2 - C3 - 1
1.4. Validação	M2 - C3 - 2

#### Referências Bibliográficas

M2 - RB - 1

#### Anexos

M2 - A - 1

Anexo I: Procedimentos utilizados para manutenção e estocagem de microrganismos	M2 - A - 1
Anexo II: Planilhas para controle interno da qualidade	M2 - A - 3
Anexo III: Relatórios de Registro da Realização do Controle Interno da Qualidade - Hospital	M2 - A - 15
Anexo IV: Relatórios de Registro da Realização do Controle Interno da Qualidade - LACEN	M2 - A - 19



# Introdução

O programa de controle interno da qualidade é um conjunto de ações que visam garantir a qualidade e reprodutibilidade dos processos e dos resultados produzidos por meio da verificação contínua dos fatores que interferem nessa. Deve ser visto como uma oportunidade de aprimoramento das atividades desenvolvidas no laboratório. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>1</sup> a implantação de um programa da qualidade é necessária para:

- melhorar a qualidade dos serviços de saúde;
- gerar resultados confiáveis e reproduzíveis;
- propiciar que resultados interlaboratoriais sejam comparáveis;
- aumentar a credibilidade do laboratório entre os médicos e seus clientes;
- motivar os funcionários a melhorar o desempenho; e
- prevenir de complicações legais que podem seguir a liberação de exames de baixa qualidade.

Muitos fatores interferem na qualidade dos resultados liberados pelo laboratório de microbiologia, como por exemplo: (a) a seleção, coleta, transporte e acondicionamento apropriados do espécime biológico; (b) o treinamento, comprometimento e motivação do pessoal de laboratório; (c) fatores ambientais, como luminosidade deficiente ou excessiva, ventilação e condições do local de trabalho; (d) fatores analíticos, como baixa qualidade dos reagentes, vidraria, corantes, meios de cultura e falta de equipamentos precisos; e (e) erros de transcrição de resultados, resultados liberados incompletos e interpretação errada das provas bioquímicas ou antibiograma<sup>1</sup>.

Este guia é um instrumento que tem como objetivo oferecer subsídios aos laboratórios de microbiologia na elaboração do manual de procedimentos operacionais padrão (POP) que deve ser construído pelo laboratório. Ele faz parte do Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde elaborado e disponível na página eletrônica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)<sup>2</sup>. Este deve ser utilizado em consonância com a Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), Boas Práticas de Laboratórios, Norma Brasileira Reguladora - NBR ISO/ IEC 17025 por microbiológicos e biológicos e Resolução Diretoria Colegiada - RDC 302, de 13 de outubro de 2005.

Os documentos aqui apresentados contêm informações básicas acerca da realização, da frequência e das indicações dos testes de controle interno da qualidade (CIQ) dos laboratórios de microbiologia clínica, na **fase analítica**.

## 1. PARÂMETROS PARA UM PROGRAMA DE CONTROLE DA QUALIDADE<sup>2,3</sup>

### I - FASE PRÉ-ANALÍTICA

#### A) Garantia da qualidade das amostras clínicas

O laboratório de Microbiologia deve elaborar um manual de instruções, contemplando os seguintes itens:

- coleta, identificação e conservação da amostra;
- transporte da amostra, estabelecendo meio recomendado, prazo, condições de temperatura e padrão técnico para garantir a sua integridade e estabilidade;

- critérios para o preparo do cliente com instruções claras e escritas em linguagem acessível, sendo que somente as instruções simples e de fácil compreensão podem ser dadas verbalmente;
- critérios para a aceitação ou rejeição das amostras; e
- documentação das informações relacionadas às amostras coletadas, como data, horário e responsável pela coleta e eventuais intercorrências, garantindo sua rastreabilidade durante todo o processo.

## II - FASE ANALÍTICA

### A) Manual de Procedimentos Operacionais Padrão (POP)

O laboratório de Microbiologia deve elaborar os documentos internos de procedimentos, seguindo as indicações de GP2-A4 do CLSI (Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals; Approved Guideline - Fourth Edition (2002) e deste documento.

- Os POP's deverão conter, no mínimo: técnica, limites de tolerância, aceitação e rejeição da amostra, preparo de reagentes, controle de qualidade (CQ), cálculos, critérios de liberação de resultados.
- Revisar os documentos, anualmente, ou sempre que ocorrer mudanças nos processos descritos.
- Disponibilizar as informações escritas no ambiente de trabalho.

### B) Garantia da qualidade técnica dos colaboradores

- Oferecer e documentar capacitação técnica para as atividades desempenhadas na rotina do laboratório de microbiologia.
- Manter programa de capacitação para o uso apropriado de equipamentos.
- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) e equipamentos de proteção coletiva (EPC) e cumprir as normas de biossegurança.
- Participar ativamente junto à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), fornecendo dados epidemiológicos de diferentes agentes etiológicos de infecção hospitalar e seus perfis de sensibilidade.
- Armazenar cepas de interesse para estudos.
- Os resultados dos procedimentos e testes devem ser conferidos quanto à exatidão, reprodutibilidade e concordância com os padrões de CQ pelo responsável designado.

### C) Desempenho dos equipamentos e instrumentos

- Elaborar e manter um programa de manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos.
- Manter registro diário de temperaturas dos equipamentos de banho-maria, estufa, freezer, geladeira e meio ambiente.
- Fazer controle da eficácia do processo de esterilização das autoclaves (*Bacillus stearothermophilus*).
- Dispor de manual de funcionamento do equipamento em português.
- Estabelecer cronograma de manutenção preventiva.
- Registrar a manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos em uso.
- Documentar o estado de calibração dos equipamentos e instrumentos usados nos processos analíticos, como pipetas automáticas e pipetadores, termômetros, centrífugas, microscópios, espectrofotômetros, turbidímetro, balanças analíticas, pHmetro, equipamentos analíticos, etc.
- Documentar a verificação do funcionamento do equipamento.
- Documentar a realização da limpeza dos equipamentos.
- Manter e documentar a higienização periódica de fluxos, cabines de segurança, capelas, geladeiras, freezer, banho-maria, centrífugas, estufas, etc.

- Documentar a utilização de cepas de referência para o CIQ de acordo com as especificações do equipamento.
- Documentar alertas emitidos pelo equipamento.
- Atualizar *software* a cada mudança, documentando as modificações.
- Definir os limites de aceitabilidade para as inexatidões encontradas nas calibrações, verificações e comparações entre equipamentos, e garantir a implementação de ações corretivas para os eventuais desvios.

#### D) Controle da Qualidade dos Insumos Laboratoriais (CQIL)

##### D1. Corantes e reagentes

- Respeitar as orientações escritas dos fabricantes para o uso dos reagentes.
- Solicitar cópia dos laudos qualitativos junto ao fabricante para cada lote recebido.
- Rotular cada produto com: nome, número do lote, concentração, condições de estocagem, data do preparo, recebimento, quando foi colocado em uso e prazo de validade.
- Testar com controles positivos e negativos antes do uso, conforme o tipo de teste.
- Se os resultados não forem satisfatórios notificar o fornecedor e o SNVS.
- Descartar o produto se o controle não estiver apropriado.
- Definir e documentar o grau de pureza da água reagente utilizada nas análises, assim como a forma de obtenção e controle dessa água.

##### D2. Meios de cultura

- Documentar a quantidade de meio preparado no laboratório, número do lote, método de esterilização, data do preparo, pH, validade e técnico responsável pela preparação.
- Realizar e documentar teste de esterilidade e desempenho dos meios preparados no laboratório, utilizando cepas de referência, tipo ATCC.
- Observar o meio quanto a cor, consistência, profundidade e/ou superfície, hemólise, presença de bolhas e contaminação.
- Documentar o número do lote e a data de recebimento dos meios comerciais. Solicitar ao fornecedor o certificado de controle de qualidade, conforme recomendações do CLSI.
- Documentar os meios que não estejam de acordo com os padrões, as ações corretivas tomadas e informar ao fornecedor e ao SNVS.

##### D3. Discos e fitas E-test

- Testar os discos ou fitas E-test de antimicrobianos, cartões ou painéis com antibióticos, diariamente, por 20 dias consecutivos, a fim de validar a metodologia. Utilizar cepas de referência, tipo ATCC.
- Seguir, rigorosamente, as recomendações do fabricante quanto ao armazenamento dos discos antimicrobianos.
- Documentar os discos de antimicrobianos que não estejam de acordo com os padrões CLSI, as ações corretivas tomadas e informar ao fornecedor e SNVS.

##### D4. Kits comerciais e anti-soros

- Verificar se há registro do *kit* junto ao ministério da saúde [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- Testar os *kits* e anti-soros de um novo lote em paralelo com o lote anterior ou com cepas de referência, antes de colocá-los em uso. Utilizar controles positivos e negativos, juntamente com cepas de referência recomendadas. Documentar os resultados desses testes.

- Seguir as recomendações do fabricante para o teste do controle da qualidade.
- Registrar as informações contidas no rótulo do *Kit* para rastreabilidade do processo.
- Notificar ao fornecedor e SNVS os desvios de qualidade encontrados.

### III - FASE PÓS-ANALÍTICA

- Documentar a liberação de resultados, emissão e entrega de laudos.
- Garantir a confidencialidade dos resultados dos laudos.
- Fornecer aos colaboradores uma avaliação periódica de desempenho do laboratório no controle interno, verificando a abrangência e adequação desses controles.

## 2. CEPAS DE REFERÊNCIA<sup>6,7</sup>

### 2.1. DEFINIÇÕES<sup>6</sup>

As **cepas de referência** destinam-se à verificação dos resultados obtidos, pois suas características fenotípicas já são conhecidas, ou seja, sua identificação e seu perfil de sensibilidade já foram determinados.

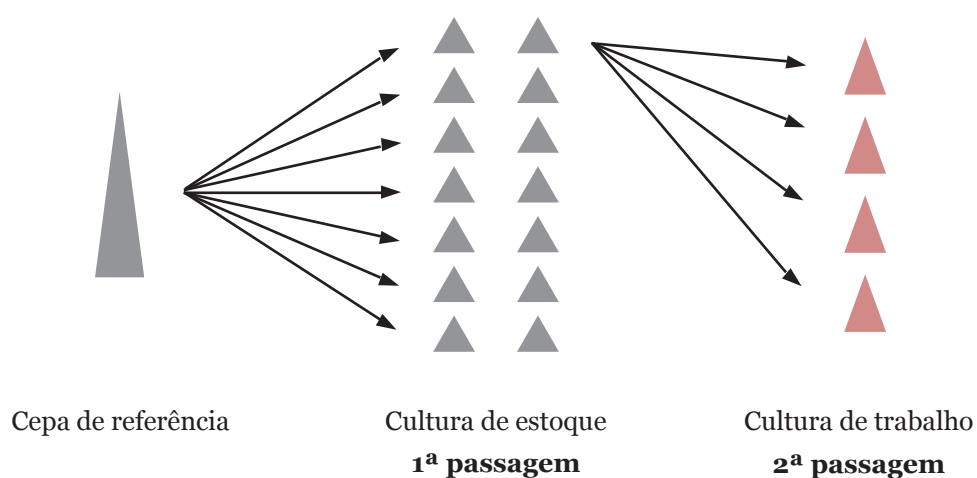
As cepas de referência devem possuir uma origem confiável, vindo de um laboratório de referência que realiza testes fenotípicos e moleculares para confirmar sua identificação e perfil de sensibilidade.

Define-se como **cultura de estoque** o subcultivo das cepas de referência. Essa cultura é armazenada no laboratório de microbiologia (a -20°C ou menos) e é descongelada anualmente.

A **cultura de trabalho** é o subcultivo semanal ou mensal da cultura de estoque e será mantida no laboratório (4°C a 8°C) para realização dos testes diários ou semanais de CIQ.

Uma **passagem** é a transferência do organismo de uma cultura viável para um novo meio de cultura com crescimento de microrganismos. A hidratação (ou descongelamento) de uma cepa de referência não é considerada uma passagem ou repique. A **primeira passagem** será o subcultivo da cepa de referência para a cultura de estoque. A transferência do microrganismo da cultura de estoque para a cultura de trabalho será a **segunda passagem** (Figura 1).

FIGURA 1. PROPAGAÇÃO DA CULTURA DE BACTÉRIAS<sup>4</sup>



2.2. TABELA 1: INDICAÇÃO DE USO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA<sup>4,5</sup>

Microrganismos	Teste indicado
<b>Gram-negativos</b>	
<i>E. coli</i> ATCC 25922 - Cepa não produtora de $\beta$ -lactamase.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova de DD e CIM de enterobactérias</li> <li>• Qualidade da prova de DD e CIM de <i>Pseudomonas</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>S. maltophilia</i> e <i>Burkholderia</i></li> <li>• Qualidade da prova de DD e CIM de <i>Vibrio colerae</i></li> <li>• Testes de triagem e confirmatório de ESBL</li> <li>• Qualidade da prova em testes automatizados de susceptibilidade em painéis de gram negativos</li> </ul>
<i>E. coli</i> ATCC 35218 - Cepa produtora de $\beta$ -lactamase  <i>Deve ser mantida a -60°C para prevenir perda do plasmídeo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova de DD e CIM para de <math>\beta</math>-lactâmicos e inibidores de <math>\beta</math>-lactamase</li> <li>• Qualidade da prova de DD e CIM para Amoxicilina - Ac. clavulânico de <i>Haemophilus spp</i></li> <li>• VITEK GNS MIC painel QC set</li> <li>• Testes automatizados para inibidores de <math>\beta</math>-lactamase em painéis de gram-negativos</li> </ul>
<i>E. coli</i> ATCC 51446	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes automatizados de para ESBL</li> </ul>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes automatizados de identificação de bacilos gram-negativos</li> </ul>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 - Cepa produtora de $\beta$ -lactamase de espectro ampliado  <i>Deve ser mantida a -60°C para prevenir perda do plasmídeo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes de triagem e teste confirmatório de ESBL</li> </ul>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Sensível aos agentes anti-pseudomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de diluição em caldo e diluição em ágar de <i>P. aeruginosa</i> e outros não-enterobacteriaceas</li> <li>• Testes automatizados para verificação da concentração de cátion e pH com aminoglicosídeos em painéis de gram-negativos</li> </ul>
<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes automatizados de identificação de bacilos gram-negativos</li> </ul>

2.2. TABELA 1: INDICAÇÃO DE USO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA<sup>4,5</sup>

Microrganismos	Teste indicado
<b>Gram-positivos</b>	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 - Sensível a vancomicina, ampicilina e altos níveis de aminoglicosídeos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adequação do meio para testes de sulfonamidas e trimetropim, DD e CIM</li> <li>• Qualidade da prova de CIM para <i>Enterococcus</i> spp</li> <li>• Teste de triagem de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e à vancomicina</li> <li>• Qualidade da prova em testes automatizados de identificação e susceptibilidade de gram-positivos</li> </ul>
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 - Resistente a vancomicina e altos níveis de aminoglicosídeos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste de triagem de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e à vancomicina</li> <li>• Testes automatizados de susceptibilidade a vancomicina para gram-positivos</li> </ul>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 - Cepa não produtora de β-lactamase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de DD para <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp</li> </ul>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 - Cepa produtora de β-lactamase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de CIM para <i>Staphylococcus</i> spp</li> <li>• Teste confirmatório de susceptibilidade a Oxacilina</li> <li>• Qualidade da prova em testes automatizados de identificação e susceptibilidade de gram-positivos</li> </ul>
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 - Resistente a oxacilina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste confirmatório de susceptibilidade a Oxacilina</li> </ul>
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 - Intermediário para penicilina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova de DD da susceptibilidade de <i>S. pneumoniae</i> ou <i>Streptococcus</i> spp</li> </ul>
<b>Leveduras</b>	
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes automatizados de identificação de leveduras</li> </ul>
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de susceptibilidade por CIM e DD de fluconazol</li> </ul>
<i>C. kruzei</i> ATCC 6258	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de susceptibilidade por CIM de leveduras</li> </ul>
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de susceptibilidade por DD de fluconazol</li> </ul>
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade da prova em testes de susceptibilidade por DD de fluconazol</li> </ul>

# Controle da qualidade em testes de sensibilidade para Bacteriologia

## 1. CEPAS DE REFERÊNCIA

### 1.1. MANUSEIO E ESTOCAGEM

As cepas de referência têm um número máximo de gerações a qual podem ser submetida, são **cinco passagens** a partir da cepa de referência original<sup>6</sup>. O número indefinido de passagens pode comprometer principalmente a pureza da cultura e as características fenotípicas de algumas bactérias.

Seguindo os procedimentos descritos neste documento e em condições ideais de armazenagem, a passagem para a produção das culturas de estoque pode ser anual e a passagem das culturas de trabalho pode ser realizada a cada três semanas.

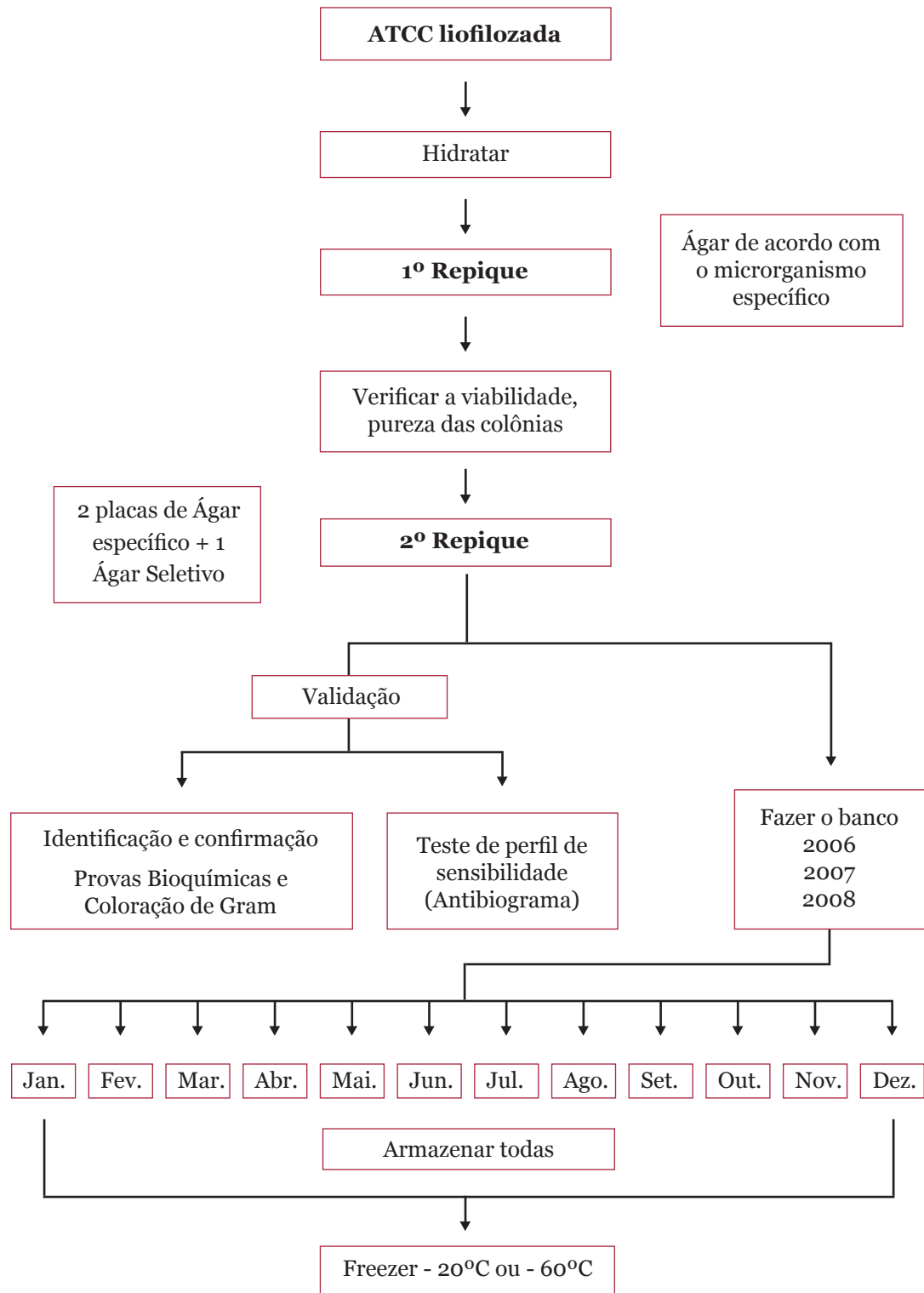
Algumas cepas devem ser mantidas em condições especiais devido a suas características intrínsecas (ex. cepas exigentes).

- As cepas de controle da qualidade devem ser testadas usando os mesmos materiais e métodos empregados para testes de isolados clínicos.
- No caso de armazenamento prolongado, as culturas de referência devem ser mantidas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , ou menos, (de preferência a  $-60^{\circ}\text{C}$  ou menos, ou em nitrogênio líquido) em meio estabilizador recomendado.
- Meios utilizados para a manutenção das cepas de referência (Figura 2):
  - *Skin milk* a 20% (p/v) de leite desnatado em pó dissolvido em água destilada, autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
  - Caldo de soja triptica a 10 - 20% de glicerol (v/v), autoclavar  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
  - Sangue de coelho desfibrinado.
- OBS: Os criotubos com selo de proteção interna são os mais utilizados para o processo de armazenamento dessas amostras. Os criotubos são preparados com antecedência, em volumes que em geral estão em torno de 0,5mL por tubo, e previamente testados quanto à esterilidade.

#### A) Partindo da cepa original liofilizada:

- Ressuspender a cepa liofilizada, conforme as recomendações do fabricante.
- Homogenizar o frasco.
- Semear em meio de cultura específico (Ágar Sangue, MacConkey ou Ágar Chocolate).
- Fazer **dois** repiques.
- Identificar através de provas bioquímicas manuais ou automatizadas e coloração de Gram.
- Realizar testes de sensibilidade antimicrobianos.
- Depois de certificar a identificação e os testes de sensibilidade, armazenar a cepa.
- Transferir as colônias recentes de 18 a 24 horas, em 15 frascos estéreis (criotubos), para cada cepa de referência a ser utilizada no controle.
- Etiquetar os frascos com o nome do microrganismo, número da cepa de referência, a data do armazenamento e o mês a ser utilizado (janeiro a dezembro). Nos outros três frascos, colocar a data dos três anos seguintes para realizar o mesmo procedimento.
- Armazenar em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-60^{\circ}\text{C}$  (Figura 2).

FIGURA 2. FLUXOGRAMA PARA MANUSEIO E ESTOCAGEM DA CEPA DE REFERÊNCIA

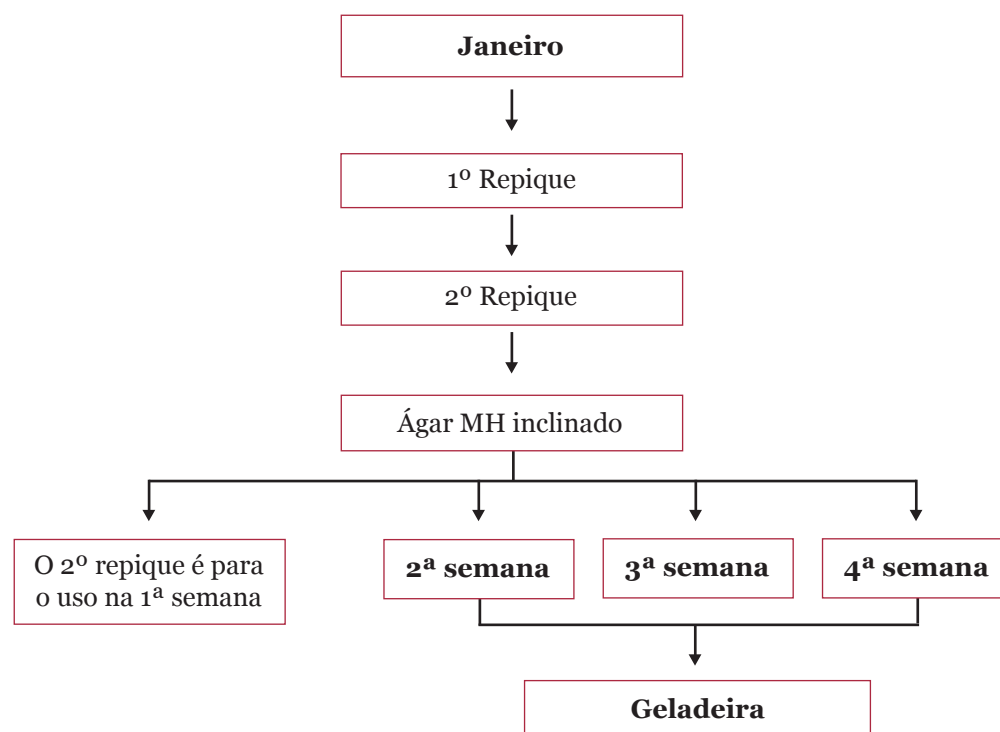




B) Partindo da cepa congelada:

- Retirar o criotubo com a cepa (ex.: janeiro) do freezer e com o auxílio de uma alça bacteriológica, semear a amostra ainda congelada em meio específico.
- Incubar a placa por 18 a 24 horas em temperatura e atmosfera recomendadas.
- Fazer um segundo repique utilizando duas placas.
- Numa das placas, fazer os testes de sensibilidade a antimicrobianos (para a 1ª semana).
- Na outra placa, semear a cepa em três tubos de Ágar Müeller Hinton inclinado.
- Incubar por 18 a 20 horas em temperatura e atmosfera recomendadas.
- Colocar esses tubos na geladeira (2 a 8°C) para serem utilizados nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos para a 2ª, 3ª e 4ª semanas do mês, **repicar apenas uma vez**.
- Esse procedimento deve ser realizado para todas as cepas envolvidas no CIQ (Figura 3).
- OBS: As culturas congeladas ou liofilizadas devem ser cultivadas duas vezes antes de se realizar os testes de sensibilidade.
- Atenção especial à manutenção do organismo (subcultivo mínimo) e seu armazenamento (ex.- 60°C ou menos) são particularmente importantes para as cepas CIQ *E. coli* ATCC 35218 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, visto que tem sido documentada a perda espontânea do plasmídeo que codifica a  $\beta$ -lactamase.
- Deve-se preparar um novo lote de cultivos se forem obtidos resultados aberrantes.

FIGURA 3. FLUXOGRAMA PARA MANUSEIO DA CEPA DE REFERÊNCIA NO CONTROLE DA QUALIDADE



## 2. CONTROLE DE TURBIDEZ PARA A PREPARO DO INÓCULO<sup>7</sup>

Para padronizar a densidade do inóculo para um teste de sensibilidade, deve-se usar um controle de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland ou seu equivalente óptico (ex., suspensão de partículas de látex). A solução padrão 0,5 de McFarland de BaSO<sub>4</sub> pode ser preparada da seguinte maneira.

- Acrescenta-se uma alíquota de 0,5mL de BaCl<sub>2</sub> 0,048 mol/L (1,175% v/v BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O) a 99,5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18mol/L (1% v/v), homogeneizando constantemente para manter a suspensão.
- A densidade correta do controle de turbidez deve ser verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1-cm e cubeta apropriada para determinar a absorvância. A absorvância da solução padrão 0,5 de McFarland deverá variar de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm.
- A suspensão de sulfato de bário deve ser transferida, em alíquotas de 4 a 6 mL, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho usados para cultivar e diluir o inóculo bacteriano.
- Esses tubos devem ser selados hermeticamente e armazenados em local escuro, à temperatura ambiente.
- O controle de turbidez de sulfato de bário deve ser agitado vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex antes de cada uso, verificando se está uniformemente túrbido. No caso de precipitação visível, o controle deve ser substituído. As suspensões de partículas de látex devem ser misturadas invertendo-as suavemente, e não num misturador tipo vórtex.
- Os controles de sulfato de bário devem ser substituídos, ou suas densidades verificadas, todo mês.

## 3. MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

O método de Kirby-Bauer ou disco-difusão é recomendado para algumas combinações microrganismo/ antimicrobiano e é muito utilizado em nosso meio. Sua praticidade, baixo custo e facilidade operacional facilitam a implantação deste método nos laboratórios de microbiologia clínica.

Alguns fatores relacionados ao preparo do meio de cultura e sua composição podem interferir no resultado final liberado pelo laboratório. A confirmação da qualidade, esterilidade e composição do meio de cultura devem ser avaliadas através dos testes de CIQ.

### 3.1. FREQUÊNCIA DOS TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE

A frequência dos testes de CIQ deve ser no mínimo mensal. Entretanto, as recomendações nacionais e internacionais<sup>2,6</sup> preconizam testes semanais. Essas recomendações devem ser seguidas se a estrutura ou a capacidade do laboratório permitir.

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

- **Teste diário** - Testar todas as cepas de controle pertinentes durante cinco dias consecutivos e documentar os resultados.
- Para passar a realização dos testes de diária para mensal nenhuma das cinco leituras de halos, para cada combinação de agente/antimicrobiano, pode estar fora dos limites aceitáveis.

- **Teste mensal** - Testar todas as cepas de CIQ no mínimo mensalmente e sempre que qualquer novo reagente do teste for utilizado (ex.: um novo lote de ágar ou meio, um novo lote de discos ou outro fabricante de insumos).
- Documentar a realização dos testes de controle da qualidade, anotando os números dos lotes, meios de cultura, reagentes, discos de antibióticos testados nas respectivas datas e mês.
- Sempre que algum resultado dos testes mensal de controle da qualidade estiver fora da faixa aceitável, faz-se necessário implantar ação corretiva<sup>6</sup>.
- Sempre que um novo agente antimicrobiano for acrescentado ou houver mudanças importantes no método de leitura dos resultados dos testes, estes devem ser realizados por cinco dias consecutivos e documentados, antes de se passar para uma frequência mensal.

### 3.2. TESTE DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA<sup>6</sup>

#### A) Meio de cultura

O meio indicado para os testes de disco-difusão em organismos não fastidiosos é o Ágar Müeller-Hinton (MH).

#### B) Espessura

A espessura do meio deve ser de 4 mm uniformemente distribuída. Volumes médios utilizados: 60 a 70 mL / placa de 150 mm e 25 mL / placa de 90 mm.

#### C) Esterilidade

- Após preparo das placas, examinar uma amostra significativa (10%) e aleatória de cada lote das placas para confirmar sua esterilidade, mediante sua incubação a 30°C - 35°C por, pelo menos, 24 horas.
- As placas devem ser usadas até sete dias após o preparo, a não ser que sejam tomadas precauções adequadas, como embrulhá-las em saco plástico, para minimizar o ressecamento do ágar.

#### D) pH

- O pH de cada lote de Ágar Müeller-Hinton deve ser verificado quando o ágar é preparado. O meio ágar deverá ter pH entre 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente após solidificação.
- A medida do pH deve ser feita preferencialmente através de pHmetro apropriado, submerso em porção de meio solidificado à temperatura ambiente. Caso esteja fora das especificações, deve-se checar a procedência do meio, a qualidade da água e, eventualmente, preparar novo lote seguindo estritamente as recomendações do fabricante<sup>6</sup>.
- Métodos de verificação de pH (ver CLSI Norma M2-A9<sup>6</sup> ou norma substituta):
  - Macerar uma quantidade suficiente de ágar para submergir a ponta de um eletrodo do pHmetro calibrado.
  - Ou permitir que uma pequena quantidade de ágar solidifique-se em torno da ponta de um eletrodo do pHmetro calibrado.
  - Ou em um béquer contendo o ágar usar um eletrodo de superfície devidamente calibrado.

#### E) Efeitos da timidina ou timina

- Excesso dessas substâncias pode levar a falsas resistências para sulfa-trimetoprim. Portanto, deve-se usar meio Ágar Müeller-Hinton com o menor teor possível de timina ou timidina

- O teor de timidina ou timina deve ser testado com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 com discos de sulfametaxol/trimetoprim. Um meio satisfatório produzirá halos de inibição nítidos com diâmetro  $\geq 20$  mm.

#### F) Efeitos de Variação nos Cátions Divalentes

- As variações nos cátions divalentes, principalmente magnésio e cálcio, afetarão os resultados dos testes dos aminoglicosídeos e da tetraciclina e variação nos níveis de cálcio também afeta os resultados dos testes de daptomicina. Realizar teste de qualidade da prova para estes agentes antimicrobianos.

#### G) Armazenamento de Discos Antimicrobianos

Os discos devem ser armazenados conforme indicado a seguir.

- Refrigerar os recipientes a temperatura de 8°C ou menos, ou congelar a -15°C ou mais frio, num congelador comum (não do tipo “frost-free”) até o momento de usar.
- Os pacotes fechados de discos contendo drogas da classe de  $\beta$ -lactâmicos devem ser armazenados congelados, com exceção de um pequeno número de discos reservados para o trabalho cotidiano, que pode ser refrigerado (entre +4°C e +8°C) durante, no máximo, uma semana.
- Alguns agentes lábeis (ex., combinações de ácido clavulânico, carbapenêmicos e cefaclor) devem ser armazenados congelados até o uso.
- Os recipientes fechados de discos devem ser retirados da geladeira ou congelador **uma ou duas horas** antes de serem usados, para que se equilibrem em temperatura ambiente antes de serem abertos.
- Após retirar o cartucho de discos do pacote selado, colocá-lo num dissecador.
- Quando se usa um dissecador, este deve ser tampado hermeticamente, acrescentando-se um dissecante recomendado. Deve-se deixar que a temperatura do dispensador chegue à temperatura ambiente antes de abri-lo. Evitar umidade excessiva, substituindo o dissecante sempre que o indicador mudar de cor.
- Quando não estiver em uso, o dispensador de discos deve ser mantido refrigerado.
- Apenas os discos dentro do prazo de validade do fabricante podem ser usados. Os discos devem ser descartados no vencimento.

### 3.3. TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE DA PROVA E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE

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

O controle da acurácia dos testes realizados deve ser feito utilizando-se as cepas referência para o gênero ou espécie do microrganismo ou classe de antimicrobiano que está sendo testado.

Serão testados os antimicrobianos que fazem parte do antibiograma utilizado na rotina do laboratório. Ex. Se o laboratório testa para *Enterococcus* spp ampicilina, ciprofloxacina, clorafenicol, teicoplanina, vancomicina, quinupristin/dalfopristin, estes mesmos antimicrobianos serão testados com a cepa referência *S. aureus* ATCC 25923 (ver abaixo) para avaliar a qualidade da prova realizada, e os halos encontrados serão comparados com os valores de referência<sup>7</sup>.

Os limites aceitáveis para os halos encontrados para as cepas de referências e os diversos antimicrobianos são descritos em CLSI norma M100-S16<sup>7</sup> ou norma substituta.

A) Condições dos testes de controle da qualidade e cepas de referência usadas para monitorar a acurácia dos testes de disco difusão

#### **Enterobactérias**

- Meio: Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 18 horas
- Cepas referência: *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase)

#### **Detecção de ESBL em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *P. mirabilis***

##### **Testes de triagem e confirmatório de ESBL**

- Meio: Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 18 horas
- Cepas de referência: *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603

#### ***P. aeruginosa***

- Meio: Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 18 horas
- Cepas de referência: *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 e/ou *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase)

#### ***Acinetobacter* spp, *S. maltophilia* e *B. cepacia***

- Meio: Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 20 a 24 horas
- Cepas de referência: *P.aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 e/ou *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase)

#### ***Staphylococcus* spp**

- Meio: Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão de 0,5 de McFarland.
- Incubação: 33 a 35°C, ar ambiente, de 16 a 18 horas; 24 horas para oxacilina, cefoxitina, meticilina, nafcilina e vancomicina.

- Cepas de referência: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 35218 (para combinações  $\beta$ -lactâmicos/inibidor de  $\beta$ -lactamase), *S. aureus* ATCC BAA-977 e/ou BAA-976 (teste de indução à clindamicina)

#### ***Enterococcus* spp**

- Meio: Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C  $\pm$  2 graus, ar ambiente, de 16 a 18 horas; 24 horas para vancomicina.
- Cepas de referência: *S. aureus* ATCC 25923; *E. faecalis* ATCC 29212 para os testes de detecção de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos.

#### ***S. pneumoniae* ou *Streptococcus* spp**

- Meio: Ágar Müeller-Hinton com 5% de sangue de carneiro
- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland.
- Incubação: 35°C  $\pm$  2 graus, CO<sub>2</sub> a 5%, de 20 a 24 horas.
- Cepas de referência: *S. pneumoniae* ATCC 49619

#### ***Haemophilus influenzae* e *H. parainfluenzae***

- Meio: *Haemophilus Test Medium* ( HTM ) – ver CLSI Norma M2-A9
- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland
- Incubação: 35°C  $\pm$  2 graus, CO<sub>2</sub> a 5%, de 16 a 18 horas.
- Cepa de Referência: *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766, *E. coli* ATCC 35218 (quando testar amoxicilina - ácido clavulânico).

## **4. MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO OU ÁGAR (CIM)**

Os testes de diluição em caldo ou em ágar são utilizados para a determinação da sensibilidade *in vitro* de um microrganismo a um agente antimicrobiano. Por este método se determina a concentração inibitória mínima (CIM) de um antimicrobiano, ou seja, a menor concentração de antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo. Esse método é também utilizado na confirmação de alguns perfis de resistência detectados inicialmente por disco-difusão.

Falhas na detecção do padrão de resistência pelos métodos dilucionais podem estar relacionadas a diversos fatores, como: má qualidade do meio de cultura, concentração de cátions ou pH fora da faixa recomendada, baixa concentração de antimicrobiano, solução estoque de antibiótico com concentração fora do preconizado, falhas no procedimento técnico, inóculo com concentração de microrganismos fora do preconizado, tempo e temperatura de incubação não recomendadas.

Os testes de CIQ avaliam os parâmetros críticos para a detecção da resistência. E devem ser realizados nas mesmas condições e pelo mesmo pessoal técnico que realiza os testes de rotina.

#### 4.1. FREQUÊNCIA DOS TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE <sup>3,6</sup>

A frequência dos testes de CIQ deve ser no mínimo mensal. Entretanto, as recomendações nacionais e internacionais<sup>2,6</sup> preconizam testes semanais. Essas recomendações devem ser seguidas se a estrutura ou a capacidade do laboratório permitirem.

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

- **Teste diário** – Testar todas as cepas de controle pertinentes durante cinco dias consecutivos e documentar os resultados.
- Para passar os testes de diários para mensais nenhuma das cinco leituras de CIM para cada combinação de microrganismo/antimicrobiano pode estar fora dos limites aceitáveis.
- **Teste mensal** – Testar todas as cepas de controle no mínimo mensalmente e sempre que qualquer reagente do teste for utilizado (ex. um novo lote de ágar ou meio, um novo lote de antimicrobianos ou outro fabricante de insumos).
- Sempre que algum resultado dos testes mensais de controle de qualidade estiver fora da faixa aceitável, faz-se necessário implantar ação corretiva<sup>3</sup>
- Sempre que um novo agente antimicrobiano for acrescentado ou houver mudanças importantes no método de leitura dos resultados dos testes (ex. conversão de leitura visual da CIM para leitura instrumental ou mudança no tipo de painel usado), estes devem ser realizados por cinco dias consecutivos e documentados, antes de se passar para uma frequência mensal.

#### 4.2. FREQUÊNCIA DOS TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA TESTES DE TRIAGEM

- Testes em placas para triagem de resistência a vancomicina e de resistência de alto-nível de aminoglicosídeos podem ser realizados no mínimo mensalmente, desde que o laboratório realize os testes rotineiramente e os critérios de mudança do sistema de teste de diário para mensal tenham sido atingidos.
- Se o teste de triagem não for realizado rotineiramente (< que uma vez/semana) ou se o agente antimicrobiano for lábil (ex. ampicilinas, meticilinas, imipenem, ácido clavulânico, ceflacor e cefamandole), será necessária a realização de testes de controle de qualidade sempre que o teste de triagem for realizado em amostras clínicas.

#### 4.3. TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE DO MEIO DE CULTURA

#### 4.4. MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR<sup>8</sup>

- Os meios indicados para os testes de diluição em Ágar são: Ágar Müeller-Hinton ou Ágar Müeller-Hinton com sangue lisado de cavalo ou sangue desfibrinado de carneiro a 5%.

##### A) Esterilidade

- Após preparo das placas, examinar uma amostra significativa de cada lote (10%) para confirmar sua esterilidade, mediante sua incubação a 30°C-35°C, por pelo menos 24 horas. As placas devem ser usadas até sete dias após o preparo, a não ser que sejam tomadas precauções adequadas, como embrulhá-las em saco plástico e protegê-las da luz quando o antimicrobiano é fotossensível.

#### B) pH

- O pH de cada lote de placas de Ágar Müeller-Hinton ou Ágar Müeller-Hinton com sangue lisado de cavalo ou sangue desfibrinado de carneiro a 5% deve ser verificado quando o ágar for preparado. O meio ágar deverá ter pH entre 7,2 e 7,4 à temperatura ambiente após solidificação.
- A medida do pH deve ser feita preferencialmente através de pHmetro apropriado, submerso em porção de meio solidificado à temperatura ambiente. Caso esteja fora das especificações, deve-se checar a procedência do meio, a qualidade da água e, eventualmente, preparar novo lote, seguindo-se estritamente as recomendações do fabricante.
- Métodos de verificação de pH – ver CLSI Norma M7-A7 ou norma substituta.

#### 4.5. MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO (MICRODILUIÇÃO E MACRODILUIÇÃO)<sup>8</sup>

- O meio indicado para os testes de diluição em caldo é **Müeller-Hinton**.

#### A) Esterilidade

- Após preparo do meio, examinar uma amostra significativa e aleatória (10%) de cada lote para confirmar sua esterilidade, mediante sua incubação a 30°C-35°C por, pelo menos, 24 horas.

#### B) pH

- O pH de cada lote de caldo Müeller-Hinton deve ser verificado quando o meio for preparado. O meio deverá ter pH entre 7,2 e 7,4 à temperatura ambiente.

#### C) Efeitos da timidina ou timina

- Para determinar a adequação do meio para testes de sulfonamida e trimetopim, os testes de CIM podem ser realizados com *E. faecalis* ATCC 29212. Os pontos finais devem ser de fácil leitura (com uma redução de 80% ou mais no crescimento, quando comparado com o controle). Se a CIM para trimetoprim-sulfametoxadol for  $\leq 0,5/0,95\mu\text{g/mL}$ , o meio poderá ser considerado apropriado para uso.

Os testes dilucionais para monitorar a acurácia dos resultados devem ser realizados com os antimicrobianos que fazem parte do antibiograma liberado pelo laboratório. Para cada gênero ou espécie de bactérias ou classe de antimicrobiano são recomendadas cepas de referência específicas.

Os limites aceitáveis para as concentrações CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) definidos para as cepas de referências e os diversos antimicrobianos são descritos – em CLSI norma M100-S16 ou norma substituta.

#### 4.6. TESTES DE QUALIDADE DA PROVA E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE

- A) Condições dos testes e cepas de controle de qualidade usadas para monitorar a acurácia dos testes de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ).

##### Enterobactérias

- Meio
  - **Diluição em caldo:** Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions
  - **Diluição em ágar:** Ágar Müeller-Hinton



- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 20 horas
- Cepas de referência: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase)

#### Detecção de ESBL em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *P. mirabilis*

##### Testes de triagem de ESBL *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*

- Meio: **Diluição em caldo**: Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions
- Concentração de Antimicrobianos:
  - Cefpodoxima 4µg/mL ou
  - Ceftazidima 1µg/mL ou
  - Aztreonam 1µg/mL ou
  - Cefotaxima 1µg/mL ou
  - Ceftriazona 1µg/mL
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 20 horas
- Cepas de referência: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603

##### Testes de triagem de ESBL *P. mirabilis*

- Meio: **Diluição em caldo**: Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions
- Concentração de Antimicrobianos:
  - Cefpodoxima 1µg/mL ou
  - Ceftazidima 1µg/mL ou
  - Cefotaxima 1µg/mL ou
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 20 horas
- Cepas de referência: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603

##### Teste confirmatório de ESBL

- Meio: **Diluição em caldo**: Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions
- Concentração de Antimicrobianos:
  - Ceftazidima 0,25 - 128µg/mL
  - Ceftazidima/ácido clavulanico 0,25/4 - 128/4µg/mL

##### **E**

- Cefotaxima 0,25 - 64µg/mL
- Cefotaxima/ácido clavulanico 0,25/4 - 64/4µg/mL
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 20 horas
- Cepas de referência: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603

***P. aeruginosa* e outros não-enterobacteriaceas (inclue *Pseudomonas* spp., e outros bacilos gram-negativos não fastidiosos e não fermentadores exceto *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *S. maltophilia* e *Acinetobacter* spp.)**

- Meio
  - **Diluição em caldo:** Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions
  - **Diluição em ágar:** Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 16 a 20 horas
- Cepas de referência: *P. aeruginosa* ATCC 27853; *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase)

***Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *S. maltophilia***

- Meio
  - **Diluição em caldo:** Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions
  - **Diluição em ágar:** Ágar Müeller-Hinton
- Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus, ar ambiente, de 20 a 24 horas
- Cepas de referência: *P. aeruginosa* ATCC 27853; *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase)

***Staphylococcus* spp.**

- Meio
  - **Diluição em caldo:** Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions + NaCl a 2% para oxacilina, metilicina e nafcilina; Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions suplementado com 50µg/mL de cálcio para daptomicina.
  - **Diluição em ágar:** Ágar Müeller-Hinton, Ágar Müeller-Hinton +NaCl a 2% para oxacilina, metilicina e nafcilina. Diluição em ágar não é recomendada atualmente para daptomicina.
- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 33 - 35°C, ar ambiente, de 16 a 20 horas, 24 horas para oxacilina, metilicina, nafcilina e vancomicina
- Cepas de referência: *S. aureus* ATCC 29213; *E. coli* ATCC 35218 (para combinações β-lactâmicos/inibidor de β-lactamase); *S. aureus* ATCC BAA-977 e/ou BAA-976 (teste de indução à clindamicina)

**Teste de triagem com ágar Oxacilina – NaCl para *S. aureus***

- Meio: **Diluição em ágar:** Ágar Müeller-Hinton + NaCl a 4% m/v e 6µg/mL de oxacilina.
- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C, ar ambiente, 24 horas.
- Cepas de referência: *E. faecalis* ATCC 29212 – sensível, *E. faecalis* ATCC 51299 - resistente.

#### Teste de triagem com ágar Vancomicina para *S. aureus*

- Meio: **Diluição em ágar:** Ágar BHI e 6µg/mL de vancomicina.
- Inóculo: Método de suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C, ar ambiente, 24 horas.
- Cepas de referência: *S. aureus* ATCC 29213 – sensível, *S. aureus* ATCC 43300 - resistente

#### *Enterococcus* spp.

- Meio
  - **Diluição em caldo:** Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions ou Caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions suplementado com 50µg/mL de cálcio para daptomicina.
  - **Diluição em ágar:** Ágar Müeller-Hinton. Diluição em ágar não é recomendada atualmente para daptomicina.
- Inóculo: Método de crescimento e suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
- Incubação: 35°C ± 2 graus ar ambiente, de 16 a 20 horas, 24 horas para vancomicina.
- Cepas de referência: *E. faecalis* ATCC 29212

#### Teste de triagem para alto nível de resistência a aminoglicosídeos e resistência a vancomicina para *Enterococcus* spp. Tabela 2D – M100-S16

- Meio
  - **Diluição em ágar:** Ágar BHI
    - ◆ Antimicrobianos:
      - 6µg/mL de vancomicina ou
      - 2000µg/mL de estreptomicina ou
      - 500µg/mL de gentamicina.
    - **Diluição em caldo:** meio BHI
      - ◆ Antimicrobianos:
        - 1000µg/mL de estreptomicina ou
        - 500µg/mL de gentamicina.
  - Inóculo: Método de crescimento ou suspensão direta das colônias, equivalente a uma solução padrão 0.5 de McFarland.
    - Ágar: colocar 10 µL da suspensão 0,5 de McFarland na superfície da placa
  - Incubação: 35°C, ar ambiente, 24 horas.
  - Cepas de referência: *E. faecalis* ATCC 29212 - sensível, *E. faecalis* ATCC 51299 - resistente.



# Controle da qualidade em testes de sensibilidade para Leveduras

O CIQ tem como objetivo monitorar os seguintes aspectos:

- precisão (repetitividade) e acurácia (exatidão) dos resultados obtidos nos testes de sensibilidade;
- desempenho dos reagentes utilizados nos testes; e
- desempenho dos técnicos que executam os testes e realizam a leitura dos resultados.

Esse objetivo é mais facilmente atingido, com uso de cepas de referência que têm sua sensibilidade aos antifúngicos pré-determinada. No entanto, isso não dispensa a adoção de outras medidas que melhoram a qualidade dos resultados.

## 1. CEPAS DE REFERÊNCIA<sup>9,10</sup>

### 1.1. CEPAS RECOMENDADAS PARA TESTES DE CIM DE 48 HORAS POR DILUIÇÃO EM CALDO

Faixa de leitura CIM: Ver tabela 4- M27-A2 ou norma substituta.

*Candida parapsilosis* ATCC 22019.

*Candida krusei* ATCC 6258.

### 1.2. CEPAS RECOMENDADAS PARA TESTES DE CIM DE 24 E 48 HORAS POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Faixa de leitura CIM: Ver tabela 5- M27-A2 ou norma substituta.

*Candida parapsilosis* ATCC 22019.

*Candida krusei* ATCC 6258.

### 1.3. CEPAS RECOMENDADAS PARA DISCO-DIFUSÃO

*Candida parapsilosis* ATCC 22019 – Intervalo de valores do halo de inibição (diâmetro em mm), esperado em testes com discos de fluconazol (25 mg) - 22-33mm.

*Candida albicans* ATCC 90028 – Intervalo de valores do halo de inibição (diâmetro em mm), esperado em testes com discos de fluconazol (25 mg) - 28-39 mm.

*Candida tropicalis* ATCC 750 – Intervalo de valores do halo de inibição (diâmetro em mm), esperado em testes com discos de fluconazol (25 mg)- 26-37mm.

## 2. MANUSEIO E ESTOCAGEM DAS CEPAS DE REFERÊNCIA

### 2.1. PREPARO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA PARA ARMAZENAMENTO

- As suspensões-padrão, preparadas de acordo com o procedimento delineado a seguir, podem ser mantidas indefinidamente, sem risco significativo de alteração nos perfis de sensibilidade ao agente antifúngico.
- Para preparar as cepas para armazenamento, deve-se obedecer ao procedimento abaixo:

- Cultivar os organismos em placas de Petri, durante uma noite, em ágar Sabouraud-dextrose, ou em ágar batata-dextrose, ou ágar enriquecido com digerido de soja-caseína.
- Selecionar várias colônias e realizar testes de sensibilidade apropriados, para demonstrar resultados esperados de sensibilidade, halo de inibição no método de disco-difusão ou CIM na macrodiluição ou microdiluição (ver item anterior para halos de referência ou Tabelas 4 e 5 do doc. M27A2 ou norma substituta para valores esperados de CIM).
- Realizar uma subcultura das cepas, que produziram os resultados esperados, no mesmo meio usado para a cultura primária e incubar para que ocorra crescimento suficiente (em geral, de um a três dias).
- Examinar, com cuidado, a morfologia e cor das colônias para se certificar da pureza da cultura.
- Suspender as colônias na solução estabilizante de glicerol a 50%, até fazer suspensão densa ou, se estiver liofilizado, suspender no meio apropriado.
- Distribuir pequenos volumes (uma ou duas gotas) da suspensão turva em recipientes estéreis recomendados para congelamento.
- Colocar esses recipientes em freezer (preferencialmente à  $-60^{\circ}\text{C}$  ou  $-20^{\circ}\text{C}$ ) ou em nitrogênio líquido.
- Quando o estoque de recipientes estiver praticamente exaurido, repete-se o processo para produzir um novo estoque.

## 2.2. ARMAZENAMENTO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA

- Para o armazenamento **prolongado** das cepas de referência. As leveduras devem ser cultivadas em ágar batata-dextrose e depois congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Alternativamente, as cepas de referência (não *Cryptococcus*) podem ser cultivadas suspendendo as células fúngicas em solução de glicerol a 50% em pequenos frascos e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Para armazenamento de **curto** prazo, as culturas-padrão de trabalho, ou seja, de uso rotineiro nos testes, devem ser cultivadas a  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em tubos de ágar-Sabouraud ou ágar sangue, em tubos inclinados, até se observar crescimento suficiente, sendo depois armazenadas à temperatura de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$ , enquanto não são utilizadas nos testes.

## 2.3. MANUSEIO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA NOS TESTES DE ROTINA

- Todas as culturas usadas em testes de sensibilidade a antifúngicos devem ser semeadas em meio isentos de antibióticos, antes de serem submetidas às análises.
- As cepas de controle de qualidade devem ser testadas usando os mesmos materiais e métodos empregados para testes de isolados clínicos.

Para o uso das cepas de referência nos testes de rotina, é necessário realizar os seguintes procedimentos:

- Retirar o recipiente da cultura do freezer ou frasco liofilizado.
- Deixar descongelar a suspensão congelada ou reidratar a cultura liofilizada.

- Realizar uma subcultura, bem distribuída, em placa de Petri, contendo ágar batata-dextrose e incubá-la a 35° C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas.
- Retirar quatro ou cinco colônias, realizar subcultura em ágar Sabouraud-dextrose ou ágar batata-dextrose e, após 24h, realizar testes de sensibilidade.
- As cepas-padrão, após seu crescimento a 35° C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24 horas em ágar-batata-dextrose, devem ser mantidas em geladeira, sob temperatura entre 2 a 8°C, como “cultura-padrão de trabalho” para uso na rotina. Essas culturas devem ser substituídas de duas em duas semanas, pelo menos, por outras do estoque congelado.
- Realizar sempre os testes de sensibilidade das colônias cultivadas durante uma noite.
- Os repiques das culturas de trabalho são preparados a cada duas semanas pelo método de transferência seriada.
- A cada três repiques da cultura de trabalho, deve-se descongelar uma nova amostra para uso em testes de rotina, para diminuir o risco de contaminação.
- Deve-se obter uma cultura de trabalho nova sempre que ocorrerem resultados aberrantes.

### 3. FREQUÊNCIA DOS TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE

#### 3.1. INTERVALOS DE CIM

As Tabelas 4 e 5 (CLSI M27-A2 ou norma substituta) apresentam os intervalos de precisão dos valores de CIM para um único teste de controle.

Em geral, um dentre 20 valores de CIM, em série de 20 testes consecutivos, pode estar fora do controle (i.e., fora da faixa definida), devido às variações aleatórias do teste. Dois resultados consecutivos, com valores fora do esperado ou mais de dois resultados fora do esperado em 20 testes de controle consecutivos, exigem medidas corretivas. Toda vez que se tomar medidas corretivas, a contagem de 20 testes consecutivos recomeça.

OBS.: Não confundir esse procedimento com o procedimento para estabelecer o desempenho satisfatório dos testes de CIM visando à realização de testes de controle da qualidade mensais, ao invés de diários.

#### 3.2. TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

Para monitorar o desempenho geral dos procedimentos para testes, recomenda-se incluir cepas de referência apropriadas, todo dia que o teste for realizado.

Esse procedimento é apenas para estabelecer o desempenho satisfatório dos testes de CIM e disco-difusão, com a finalidade de realizar testes de controle da qualidade mensais, ao invés de diários. Esse procedimento não deve ser confundido com os passos que devem ser seguidos para tomar as medidas de correção.

A frequência do monitoramento dos testes pode ser diminuída se o laboratório puder documentar desempenho satisfatório com testes de controle diários. Para esse fim, define-se desempenho satisfatório da seguinte maneira:

- documentação que comprove que todas as cepas de referência foram testadas durante cinco dias consecutivos de testes; e

- para cada combinação droga-microrganismo, nenhum dos cinco valores de CIM (i.e., valores de CIM obtidos para uma combinação droga-microrganismo durante cinco dias consecutivos de testes) ou diâmetros dos halos de inibição podem estar fora do intervalo de acurácia definidos nas Tabelas 4 e 5 em CLSI M27-A2 ou norma substituta e item cepas de referência para leveduras.

Quando essas condições forem cumpridas, será preciso testar cada cepa de referência pelo menos uma vez por mês<sup>2,6</sup> e sempre que qualquer reagente ou artigo plástico for mudado.

Sempre que for constatado um valor de CIM ou diâmetro de halo fora do intervalo de acurácia, usando o sistema de monitoramento mensal, será necessário recomeçar e manter os testes de controle diários enquanto não se definir qual é a fonte de erro para o resultado aberrante e a resolução do problema não tiver sido documentada da seguinte maneira:

- realizar os testes com cepas de referência apropriadas durante cinco dias consecutivos;
- para cada combinação droga-microrganismo, os cinco valores de CIM (ex., valores de CIM obtidos para uma combinação droga-microrganismo durante cinco dias consecutivos de testes) devem se manter dentro do intervalo de acurácia definidos nas Tabelas 4 e 5 (CLSI M27-A2);
- se a solução do problema não puder ser documentada (ex., pelo menos um dos cinco valores de CIM ou diâmetro do halo de inibição estiver fora do intervalo de acurácia) será necessário continuar os testes diários de controle da qualidade;
- o retorno à adoção de testes mensais exige documentação do desempenho satisfatório durante cinco dias consecutivos, conforme já descrito;
- no caso de algumas drogas, os testes de controle de qualidade devem ser efetuados com frequência maior do que uma vez por mês, devido à degradação relativamente rápida da droga.

#### 4. TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE DO MEIO DE CULTURA E ARTIGOS DE PLÁSTICO<sup>9</sup>

Para controle de lotes de meio de cultura e de artigos plásticos, o procedimento pode ser dividido nos passos abaixo.

- Testar cada novo lote de meio usado em tubos de macrodiluição, ou lote de placas de microdiluição, usando uma das cepas-controle da qualidade relacionadas na Tabela 4 CLSI M27-A2 ou norma substituta para determinar se os valores de CIM estão dentro do intervalo esperado; caso contrário, rejeitar o lote.
- Pelo menos um tubo de cada lote deve ser incubado, sem inocular, durante o mesmo período necessário para realizar o teste, de maneira a se verificar a esterilidade do meio.
- Os lotes novos do meio RPMI-1640 devem ser testados para verificar se seu desempenho será aceitável, antes de usá-los em testes de isolados clínicos, visto que estudos recentes demonstram que alguns lotes não têm desempenho apropriado. O pH do meio RPMI-1640 pode variar de 6,9 a 7,1 e o pH do meio Müeller-Hinton deve ficar entre 7,2 e 7,4.
- Registrar os números de lote de todos os materiais e reagentes usados nesses testes.



## 5. OUTROS TESTES DE CONTROLE UTILIZADOS NA MACRODILUIÇÃO E MICRODILUIÇÃO

### 5.1. CONTROLE DO CRESCIMENTO

Cada série de tubos na macrodiluição deve incluir um controle de crescimento do meio RPMI 1640, sem agente antifúngico, para avaliar a viabilidade das leveduras em teste. Na microdiluição uma coluna da placa de micro titulação é destinada a esse controle. Em testes de caldo, o controle do crescimento também serve como controle da turbidez para a leitura dos pontos finais de reação.

### 5.2. CONTROLE DE PUREZA

Uma alíquota de cada inóculo deve ser colocada numa placa de ágar Sabouraud-dextrose e incubada à temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  até haver crescimento suficiente para detectar possíveis culturas mistas e prover novas colônias isoladas para o caso de se tornar necessário repetição do teste.

### 5.3. CONTROLE DA LEITURA DOS PONTOS FINAIS DA REAÇÃO

A leitura dos pontos finais da reação deve ser monitorada, periodicamente, para minimizar possíveis variações nos resultados de testes de CIM, realizados por diferentes observadores. Todo pessoal de laboratório que realiza esses testes deverá ler, separadamente, um conjunto selecionado de testes de diluição. Os resultados devem ser registrados e comparados com os resultados obtidos por um técnico experiente. As cepas de referência, com valores de CIM pré-determinados, são particularmente úteis para essa finalidade, especialmente, em testes com fluconazol, em que pode ocorrer o fenômeno de *trailing*.

## 6. TESTE DA QUALIDADE DA PROVA E DO PERFIL DE SENSIBILIDADE

### A) Condições dos testes e cepas de controle da qualidade usadas para monitorar a acurácia dos testes de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )

- **Meio:** Diluição em caldo: Meio RPMI -1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho fenol) pH  $7,0 \pm 0,1$ .
- **Inóculo:** As diferentes operações de preparo do inóculo são as abaixo.
  - Deve-se realizar a subcultura (repique) dos organismos, em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata-dextrose, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade.
  - O inóculo deve ser preparado escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de  $\sim 1\text{mm}$  de cultura de 24 horas para espécies de As colônias devem ser suspensas em 5mL de solução salina estéril  $0,145 \text{ mol/L}$  ( $8,5\text{g/L NaCl}$ ; salina a  $0,85\%$ ).
  - A suspensão resultante deve ser colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala 0,5 de McFarland em comprimento de onda de 530nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL A suspensão de trabalho é produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células por mL.
- **Incubação:** A temperatura de incubação deve permanecer em  $35^{\circ}\text{C}$ .



# Controle da qualidade em testes de sensibilidade realizado por Métodos Automatizados<sup>8</sup>

## 1. ELEMENTOS ESSENCIAIS DO SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

### 1.1. FASE PRÉ-ANALÍTICA

#### A) Representante/empresa responsável pelo equipamento

- Manual de funcionamento do equipamento no idioma do país.
- Registro nacional e certificado de funcionamento *in situ* do equipamento e de qualidade dos lotes dos reagentes.
- Plano de manutenção preventiva e corretiva do equipamento.
- Programa de capacitação para o uso apropriado do equipamento.
- Fornecimento de cepas ATCC para o controle interno de qualidade de acordo com as especificações do equipamento.
- Atualização do software a cada mudança.
- Comunicação escrita dos problemas registrados que impliquem em mudança da qualidade dos resultados.

#### B) Usuário

- Manual de procedimento do laboratório para o uso do sistema automatizado.
- Capacitação de pessoal no uso do equipamento.
- Programa de manutenção preventiva e corretiva do equipamento.
- Notificação, à autoridade competente, de forma escrita, dos problemas registrados que impliquem em mudanças na qualidade dos resultados obtidos.

### 1.2. CONTROLE INTERNO DO LABORATÓRIO

#### A) Controle de temperatura

- Registro diário da temperatura ambiental.
- Registro diário da temperatura interna do equipamento.
- Registro de alertas do equipamento.
- Registro das medidas corretivas tomadas.

#### B) Preparo e padronização do inóculo

- Se for utilizado turbidímetro, deve-se calibrar e registrar diariamente transmitância.
- Definir e registrar a forma e a frequência do controle de esterilidade da solução de trabalho.

### 1.3. CONTROLE DA QUALIDADE DOS PROCESSOS AUTOMATIZADOS

#### A) Lista de cepas de referência recomendadas para testes de identificação

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

**Para painéis de Gram negativos:**

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

**Para painéis de Gram positivos:**

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

**Para painéis de Levaduras:**

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

**B) Lista de cepas de referência recomendadas para testes de sensibilidade**

**Para painéis de Gram negativos:**

- *E. coli* 25922 (qualidade da prova).
- *E. coli* 35218 (para inibidores de  $\beta$  lactamase).
- *E. coli* 51446 (ESBL).
- *P. aeruginosa* 27853 (concentração de cátions e pH com aminoglicosídeos).
- *E. faecalis* 29212 (quantidade de timina-timidina com SXT).

**Para painéis de Gram positivos:**

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

#### 1.4. VALIDAÇÃO

**A) Protocolo de controle da qualidade diário**

Prova diária por 5 dias

- Sem erro, seguir com o controle periódico.
- $\geq 1$  de cada 5 ensaios apresentarem erro, tomar ações corretivas:
  - **erro óbvio**<sup>6</sup>: testar novamente no mesmo dia e, se o resultado for o esperado, continuar com as provas diárias.
  - **erro não óbvio**<sup>6</sup>: testar novamente no mesmo dia e controlar por cinco dias consecutivos. Se todos os resultados estiverem dentro do esperado, passar ao controle mensal.

**B) Protocolo de controle da qualidade periódico**

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

## Referências Bibliográficas

1. WHO. Blood Safety and Clinical Technology Guidelines on Standard Operating Procedures for MICROBIOLOGY. [http://w3.who.org/EN/Section10/Section17/Section53/Section482\\_1790.htm](http://w3.who.org/EN/Section10/Section17/Section53/Section482_1790.htm)
2. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/index.htm>
3. Oplustil, CP *et al.* Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. São Paulo: SARVIER, 2004.
4. Reference Strains: How many passages are too many? Technical bulletin ATCC nº 6. ATCC Connection 23(2):6-7,2003
5. Ivonne D. Rankin. Aseguramiento de Calidad/Control de Calidad (AC/CC) 65. *In:* Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Editora Coordinadora Marie B. Coyle American Society for Microbiology - Organizacion Panamericana de la Salude. 2005
6. NCCLS/CLSI - Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco—difusão: Norma Aprovada – Nona Edição. Documento M2-A9 Vol.26 Nº 1. Substitui a Norma M2-A8. Vol. 23 Nº 1
7. NCCLS/CLSI - Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 16º Suplemento Informativo. Documento M100—S16. Vol. 26 Nº 3 - Substitui a Norma M100-S15 Vol. 25 Nº 1.
8. NCCLS/CLSI - Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. Documento M7—A7. Vol. 26 Nº 2. Substitui a Norma M7-A6 Vol. 23 Nº 2.
9. NCCLS/CLSI - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição. Documento M27-A2 Vol. 22 Nº 15 – Substitui a Norma M27-A. Vol. 17 Nº 9
10. NCCLS/CLSI - *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline*. NCCLS document M44-A Volume 24 Number 15.
11. Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos – PALC. Lista de requisitos PALC. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML), 2004. [http://www.sbpc.org.br/files/pdf/Requisitos\\_PALC\\_versao2004.pdf](http://www.sbpc.org.br/files/pdf/Requisitos_PALC_versao2004.pdf)
12. Relatório final de Comité de Expertos en la evaluación del desempeño para la identificación bacteriana y antibiograma con métodos automatizados Brasília, Brasil. 26 -28 octubre 2004. Vol. 23 Nº 1
13. Reimer, LG and Carrol, K.C. Procedures for Storage of Microorganisms. *In:* Manual of Clinical Microbiology, cap.7, 67-73, 8ª edição, 2003.



# ANEXOS

## ANEXO I: PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA MANUTENÇÃO E ESTOCAGEM DE MICRORGANISMOS

Microrganismos	Métodos de estocagem	Crio conservante	Temperatura de Estocagem	Viabilidade
Fungo filamentoso	Subcultivo	-----	4 a 25°C	2 a 10 anos
	Óleo mineral	-----	ambiente	1 a 40 anos
	Seco	Terra ou sílica gel	ambiente	1 a 4 anos
	Freezer	Glicerol e DMSO <sup>1</sup>	- 70°C à -196°C	2 a 30 anos
	Água destilada	-----	ambiente	1 a 10 anos
Leveduras	Liofilizado	<i>Skim milk</i> , glicerol, sacarose e DMSO <sup>1</sup>	4°C	2 a 30 anos
	Água destilada	-----	ambiente	1 a 2 anos
	Seco	Meio nutriente	ambiente	1 a 2 anos
	Agar batata dextrose	-----	- 70°C	
	Protozoários	Freezer	Glicerol ou DMSO <sup>1</sup> ou sangue + nutriente	- 70°C à -196°C
Congelador		Sangue, caldo nutriente + DMSO <sup>1</sup>	- 20°C à 40°C	
Vírus	Subcultivo	nutriente	4°C	6 meses
	Freezer	SPGA <sup>2</sup>	- 70°C à -196°C	1 a 30 anos
	Liofilizado	SPGA <sup>2</sup>	4°C	6 a 10 anos
Bactérias Gram Positivas	Subcultivo	-----	ambiente	2 a 3 meses
	Óleo mineral	-----	4°C	6 meses a 2 anos
	Congelador	Sucrose, TSB <sup>3</sup> + glicerol	- 20°C	1 a 3 anos
	Freezer	<i>Skim milk</i> , sucrose, TSB <sup>3</sup> + glicerol	- 70°C a -196°C	1 a 30 anos
	Liofilizado	<i>Skim milk</i> , sucrose	4°C	30 anos

Microrganismos	Métodos de estocagem	Crio conservante	Temperatura de Estocagem	Viabilidade
Estreptococos	Congelador	<i>Skim milk</i> , sangue de coelho	- 20°C	90 dias
	Freezer	<i>Skim milk</i> , sangue de coelho	- 70°C a -196°C	90 dias a 1 ano
	Liofilizado	<i>Skim milk</i> , sangue de coelho	4°C	6 meses a 30 anos
Bactérias Gram Negativas	Subcultivo	-----	ambiente	1 a 3 meses
	Óleo mineral	-----	4°C	1 a 2 anos
	Congelador	Sucrose, lactose	- 20°C	1 a 2 anos
	Freezer	Lactose, sucrose, TSB <sup>3</sup> + glicerol ou <i>Skim milk</i>	- 70°C a -196°C	2 a 30 anos
	Liofilizado	<i>Skim milk</i> + sucrose + lactose	4°C	30 anos
	Bactérias formadoras de esporos	Subcultivo	-----	ambiente
Óleo mineral		-----	4°C	1 ano
Seco		-----	ambiente	1 a 2 anos
Congelador		glicose	- 20°C	1 a 2 anos
Freezer		<i>Skim milk</i> , glicose	- 70°C a -196°C	2 a 30 anos
Liofilizado		<i>Skim milk</i> + lactose	4°C	30 anos
Micobactérias		Congelador	<i>Skim milk</i>	- 20°C
	Freezer	<i>Skim milk</i>	- 70°C a -196°C	3 a 5 anos
	Liofilizado	<i>Skim milk</i>	4°C	16 a 30 anos

Adaptada de: Reimer, LG and Carrol, K.C. *Procedures for Storage of Microorganisms*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, cap.7, 67-73, 8ª edição., 2003

<sup>1</sup> MSDS - dimetil-sulfóxido

<sup>2</sup> SPGA - sucrose fosfato glutamato contendo 1% de albumina bovina.

<sup>3</sup> TSB - caldo de soja tríplica



## ANEXO II: PLANILHAS PARA CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA CALIBRAÇÃO DE PIPETAS E MICROPIPETAS

Marca:..... Volume:.....  
Agente calibrador:  Próprio Laboratório  Terceirizado  Fabricante  
Metodologia:  Espectrofotometria  Gravimetria  Verificação por comparação

### REGISTRO

DADOS			CONFORMIDADE	
DATA	VALOR OBTIDO	CERTIFICADO N.º	SIM	NÃO

Informação: Especificação da exatidão, de acordo com a ASTM.

Capacidade nominal ( $\mu\text{L}$ )	Variabilidade (+/- $\mu\text{L}$ )
0,5 a 2,0	0,006
3,0 a 5,0	0,01
10	0,02
20	0,03
50	0,05
100	0,08

Obs.: Para verificação de pipetas no próprio Laboratório, há necessidade de equipamento próprio ou outra calibrada, para comparação espectrofotométrica.

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório



(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA ESTERILIDADE DOS MEIOS DE CULTURA

Meio de cultura: ..... Fabricante: ..... Lote:.....  
Critério de Aceitabilidade: Estéril

R E G I S T R O

DATA DA PREPARAÇÃO	Crescimento bacteriano		DATA DA LIBERAÇÃO	ASSINATURA
	SIM	NÃO		

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DO CONTROLE INTERNO DA ÁGUA REAGENTE

Água obtida por:  Destilação  Deionização  Osmose reversa  
 Outro processo (citar): .....

Periodicidade:  Diária  Semanal  Mensal

Marca do condutímetro: .....

Critério de aceitabilidade: Dentro das especificações da água reagente

**Temperatura da medição: .....° C**

REGISTRO

Data	Valor obtido*	Conformidade Sim Não		Tipo de Água Reagente	Assinatura
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	
				<input type="checkbox"/> I; <input type="checkbox"/> II; <input type="checkbox"/> III	

- Obs:
1. Quando o Condutímetro permitir, assinalar o valor obtido em mmho, na coluna\*.
  2. Quando o Condutímetro possuir apenas indicador luminoso, indicar nas colunas de conformidade, se a Água Reagente está conforme ou não-conforme.

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório





(Nome do Laboratório e Logomarca)  
**REGISTRO DO CONTROLE DA TEMPERATURA**

Refrigerador (Geladeira)                       Câmara Fria  
 Número:.....    Mês:.....  
 Localização:.....    Ano:.....

**REGISTRO**  
**(descrever faixa aceitável de temperatura ex.: 2 – 8°C)**

			Temperatura em °C								
Dia	Hora	Técnico	1°C	2°C	3°C	4°C	5°C	6°C	7°C	8°C	Outra
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											
31											

**Manutenção especial:**

1.  Descongelamento/Limpeza
2.  Comprovação da temperatura com termômetro externo de máxima e mínima
3.  Outros procedimentos compatíveis:.....

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório







(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA CALIBRAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CENTRÍFUGAS

Centrífuga:  Centrífuga Clínica  Micro-centrífuga

Marca:..... Modelo:..... Número: .....

Frequência da verificação e aceitabilidade: De acordo com o POP específico.

R E G I S T R O

Parâmetros			Conformidade	
DATA	R.P.M.	ASSINATURA	SIM	NÃO

Obs.:

1. Para a centrífuga clínica, de dessoração, anotar somente a conformidade com o uso diário.
2. Para outras centrífugas, anotar na coluna R.P.M. o valor das rotações encontradas com o Tacômetro.
3. Checar ainda, limpeza, vibrações, calibração do relógio (se houver), vedação da tampa, carvões, etc.
4. Copiar este formulário e preencher um para cada aparelho existente.

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DO CONTROLE DA TEMPERATURA

Congelador (Freezer)

Número: ..... Localização: .....  
Mês: ..... Ano: .....

REGISTRO  
(descrever faixa aceitável de temperatura ex.: -18 - -22°C)

			Temperatura em °C									
Dia	Hora	Técnico	-15°C	-16°C	-17°C	-18°C	-19°C	-20°C	-21°C	-22°C	-23°C	Outra
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												

**Manutenção especial:**

- Descongelamento/Limpeza
- Comprovação da temperatura com termômetro externo de máxima e mínima
- Outros procedimentos compatíveis: .....

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DAS AÇÕES CORRETIVAS

(COLOCAR O NOME DO APARELHO)

Número:..... Mês:.....

Localização:..... Ano:.....

REGISTRO

Se for encontrada alguma não conformidade, anotar a causa do problema e as ações corretivas executadas.

<b>Data</b>	<b>Causa da não conformidade</b>	<b>Ações corretivas</b>	<b>Assinatura</b>

Obs.: .....  
.....  
.....  
.....  
.....

Data: ..... / ..... / .....

Data: ..... / ..... / .....

\_\_\_\_\_  
Supervisor do Setor

\_\_\_\_\_  
Gestor de qualidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

### ANEXO III: RELATÓRIOS DE REGISTRO DA REALIZAÇÃO DO CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE - HOSPITAL

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA REALIZAÇÃO DO CIQ

Mês:..... Ano:.....

#### Gram-positivos

Data	Microrganismos	Teste realizado	Halo (cm)/ CIM (µg/mL)	Obs:
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			
	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213			
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300			
	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619			

#### Ações corretivas:

- Realização de novo teste
- Outros procedimentos compatíveis:.....

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA REALIZAÇÃO DO CIQ

Mês:..... Ano:.....

**Gram-negativos**

<b>Data</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>Teste realizado</b>	<b>Halo (cm)/ CIM (µg/mL)</b>	<b>Obs:</b>
	<i>E. coli</i> ATCC 25922			
	<i>E. coli</i> ATCC 35218			
	<i>E. coli</i> ATCC 51446			
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883			
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603			
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			
	<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002			

**Ações corretivas:**

1.  Realização de novo teste
2.  Outros procedimentos compatíveis:.....

Data:...../...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA REALIZAÇÃO DO CIQ

Mês:..... Ano:.....

**Leveduras**

<b>Data</b>	<b>Leveduras</b>	<b>Teste realizado</b>	<b>Halo (cm)/ CIM (µg/mL)</b>	<b>Obs:</b>
	<i>C. albicans</i> ATCC 14053			
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019			
	<i>C. kruzei</i> ATCC 6258			
	<i>C. albicans</i> ATCC 90028			
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750			

**Ações corretivas:**

1.  Realização de novo teste
2.  Outros procedimentos compatíveis:.....

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

(Nome do Laboratório e Logomarca)  
REGISTRO DA REALIZAÇÃO DO CIQ

Mês:..... Ano:.....

**Métodos automatizados**

<b>Data</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>Teste realizado</b>	<b>Leitura</b>	<b>Obs:</b>
	<i>E. coli</i> ATCC 25922			
	<i>E. coli</i> ATCC 35218			
	<i>E. coli</i> ATCC 51446			
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883			
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			
	<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002			
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			
	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213			
	<i>C. albicans</i> ATCC 14053			

Ações corretivas:

1.  Realização de novo teste
2.  Outros procedimentos compatíveis:.....

Data:...../...../.....

Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório



## ANEXO IV: RELATÓRIOS DE REGISTRO DA REALIZAÇÃO DO CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE - LACEN

### REGISTRO DA REALIZAÇÃO/AVALIAÇÃO DO CIQ

Mês:..... Ano:.....

Cepa de referência – .....

Colocar o Nome da Cepa (ex. E. coli ATCC 25922)

Data realização do teste	Hospital	Teste realizado	Halo (cm)/ CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	Adequação dos Resultados	Ação Hospital	Ação LACEN

Ações corretivas:

- Realização de novo teste
- Outros procedimentos compatíveis:.....

Data:...../...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura/ Visto do Diretor do Laboratório

