



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
E
DIRECÇÃO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

MANUAL DE BACILOSCOPIA E GENEXPERT



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
E
DIRECÇÃO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

MANUAL DE BACILOSCOPIA E GENEXPERT

Ficha técnica

Autores:

Carla Madeira - Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose/ INS
Khalide Azam - Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose/ INS
Nureisha Cadir - Challenge TB/ FHI 360

Revisão:

Manuel Lazáro , Zamite Chau, Cremilde Vicente, Esmeraldo Ezembro, Egidio Manuel,
Dinis Jaintilal, Luís Morais, Diosdélío Malamule

Coordenação:

Sofia Omar Viegas - Instituto Nacional de Saúde
Elizabeth Coelho - Programa Nacional de Controlo da Tuberculose

Apoio:

FHI 360 - Projecto Challenge TB

Tiragem da 1ª Edição - 2018 - 500 exemplares

Agradecimentos:

Os autores agradecem a todos os colaboradores, revisores e aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para que esta publicação se tornasse possível.

Um agradecimento especial ao Escritório Mundial de Saúde, Escritório de Doenças Infecciosas, Agência dos EUA para o Desenvolvimento Internacional, povo americano através da Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID) por apoiarem na elaboração e impressão do presente manual através do projecto Challenge TB, a Alaine Nyaruhirira e Ludgero Dimingo por terem apoiado cordialmente na obtenção de algumas figuras para o capítulo do GeneXpert.

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

PREFÁCIO

A tuberculose (TB) continua a ser uma das doenças infecciosas com maior peso no País, sendo responsável por altíssimas morbidade e mortalidade. O controlo da TB assenta no acesso rápido e equitativo ao diagnóstico e tratamento para todos os pacientes, em todo o território nacional. Uma rede de laboratórios estruturada e funcional desempenha um papel primordial para o alcance destas metas. O funcionamento com qualidade desta rede de laboratórios deve tomar em conta uma série de aspectos nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, de modo a que os resultados da testagem possam ser fiáveis, exactos e atempados.

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou o “Manual de baciloscopia da tuberculose” que orientava a realização da baciloscopia pela coloração de Ziehl Neelsen. Com a introdução e expansão de novas tecnologias, que permitem um diagnóstico mais preciso, como o GeneXpert MTB/RIF e a baciloscopia usando microscópios iLED (fluorescência), viu-se a necessidade de actualizar e disponibilizar ferramentas que garantam a padronização de novos procedimentos, com vista a melhoria da qualidade do diagnóstico laboratorial da tuberculose. O presente manual representa, portanto, uma ferramenta oportuna e imprescindível para a rede de laboratórios da tuberculose em Moçambique.

Ilesh VinodraiJani, MD. PhD.



Director-Geral do Instituto Nacional de Saúde

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

BAAR - Bacilo-álcool-ácido-resistente

CSB - Cabine de Segurança Biológica

CQE - Controlo de Qualidade Externo

Ct - Limite do ciclo

CD - Disco Compacto

EPI - Equipamento de Protecção Individual

HIV - Vírus de Imunodeficiência Humano

LCR - Líquido Cefalo-Raquidiano

LNRT - Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reacção em Cadeia de Polimerase

PNCT - Programa Nacional de Controlo da Tuberculose

POP - Procedimento Operacional Padrão

PBS - Tampão Fosfato Salino

PNAEQ - Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade

US - Unidade Sanitária

UPS - Sistema de energia ininterrupta

UICTDR - União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Respiratórias

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Planta baixa de um laboratório de baciloscopia e Xpert mostrando o fluxo unidireccional do ar
- Figura 2.** Bata de uso laboratorial
- Figura 3.** Respiradores N95 para uso laboratorial
- Figura 4.** Ilustração de uma luva bem ajustada e de uma luva com ajuste incorrecto
- Figura 5.** Ilustração de uma touca bem ajustada
- Figura 6.** Ilustração de óculos de protecção
- Figura 7.** Ilustração de um calçado de laboratório
- Figura 8.** Ilustração de um escarrador
- Figura 9.** Exemplo de enumeração das lâmina microscópicas por lápis de diamante para a realização da baciloscopia
- Figura 10.** Bacilo álcool-ácido-resistente observado ao microscópio óptico após coloração de Ziehl-Neelsen
- Figura 11.** Papel quadriculado usado para leitura microscópica
- Figura 12.** Ilustração da mudança de campo durante a leitura microscópica
- Figura 13.** Bacilo-álcool-ácido-resistente visualizado na microscopia de fluorescência

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de Classificação da OMS/UICTDR para leitura de lâminas pelo método de Ziehl-Neelsen.

Tabela 2. Escala de Classificação da OMS/UICTDR para leitura de lâminas pelo método de Fluorescência (Auramina O).

Tabela 3. Indicadores da qualidade de baciloscopias.

Tabela 4. Interpretação dos resultados positivos em função do limite do ciclo.

Tabela 5. Indicadores de qualidade do GeneXpert MTB/RIF.

INTRODUÇÃO

A baciloscopia é um método de diagnóstico da tuberculose (TB) que consiste num exame microscópico para pesquisa de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) num esfregaço de amostra clínica, preparado e corado com métodos de coloração padronizados.

Para que a baciloscopia seja positiva é preciso que a amostra tenha, entre 5.000 e 10.000 bacilos por mililitro da amostra. É um método bastante usado por ser de simples execução, rápido e de baixo custo, cuja qualidade técnica e registos são componentes importantes para considerá-la como boa ferramenta de diagnóstico e controlo da TB. Ela é importante porque permite diagnosticar pacientes com suspeita de TB, monitorar o tratamento e confirmar a cura.

Por outro lado, o ensaio de Xpert MTB/RIF e Xpert MTB/RIF Ultra são testes moleculares baseados numa PCR em tempo real, automatizado, para detecção de microbactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e resistência à Rifampicina. São testes simples, altamente sensíveis, específicos e rápidos, produzindo resultados em duas horas. Contudo, os custos por teste e a manutenção do equipamento são elevados, além de apresentar exigências operacionais que devem ser respeitadas.

O presente manual orienta, de forma padronizada, a realização da baciloscopia e GeneXpert da tuberculose enfatizando a biossegurança laboratorial, tipo de amostras e métodos de colheita, bem como a manutenção dos principais equipamentos usados, por forma a garantir um serviço de diagnóstico preciso e de qualidade.

ÍNDICE

Ficha técnica	I
Prefácio	II
Lista de abreviaturas	III
Lista de figuras	IV
Lista de tabelas	V
Introdução	VI

1. BIOSSEGURANÇA

1.1. Requisitos de biossegurança para laboratórios que realizam o diagnóstico da TB por baciloscopia e Xpert	01
1.2. Derrame em laboratórios sem Cabine de Segurança Biológica (CSB)	08
1.3. Descarte de material e resíduos	09

2. AMOSTRAS CLÍNICAS

2.1. Tipo de amostras para o diagnóstico da tuberculose	15
2.2. Colheita, conservação e transporte de amostras ao laboratório	15
2.3. Anexos	20

3. BACILOSCOPIA

3.1. Recepção das amostras no laboratório	25
3.2. Material necessário para realização da baciloscopia	25
3.3. Reagentes necessários para a realização da baciloscopia	26
3.4. Organização da área de trabalho	26
3.5. Identificação das lâminas	26
3.6. Execução do esfregaço	27

3.7.	Fixação do esfregaço	27
3.8.	Coloração do esfregaço, leitura e interpretação de resultados	27
3.9.	Conservação das lâminas	33
3.10.	Controlo e indicadores da qualidade	33
3.11.	Referências	36
3.12.	Anexos	47

4. GENEXPERT

4.1.	Procedimento técnico para a realização do GeneXpert	49
4.2.	Controlo e indicadores da qualidade	67
4.3.	Resolução de problemas	69
4.4.	Como proceder-se	72
4.5.	Referências	74

5. MANUTENÇÃO DE EQUIPAMENTOS

5.1.	Microscópio	77
5.2.	Balança	77
5.3.	Autoclave	77
5.4.	Estação de trabalho ventilada («ventilated workstation»)	78
5.5.	GeneXpert	78
5.6.	Referências	89
5.7.	Anexos	90

The background is a solid green color with a pattern of overlapping, semi-transparent squares in various shades of green, creating a textured, geometric effect.

BIOSSEGURANÇA



1. BIOSSEGURANÇA

A biossegurança em laboratórios descreve os princípios, tecnologias e práticas que são implementadas para prevenir a exposição não intencional a agentes patogénicos. Por outro lado, a introdução de medidas de segurança institucionais e pessoais destinadas a prevenir a perda, roubo, uso indevido, desvio ou libertação intencional de patógenos e toxinas denomina-se bioprotecção ou protecção biológica.

1.1. Requisitos de biossegurança para laboratórios que realizam o diagnóstico da TB por baciloscopia e Xpert

Os laboratórios que realizam o diagnóstico da TB usando a baciloscopia e tecnologia Xpert devem obedecer requisitos de biossegurança por forma a proteger o técnico, amostra e meio ambiente conforme descrito a seguir:

1.1.1. Infraestrutura

Os critérios a considerar para a instalação do laboratório são:

- Paredes, pisos e bancadas devem ser laváveis;
- Apenas equipamentos e materiais necessários aos procedimentos devem estar no laboratório, para facilitar a limpeza e a descontaminação;
- Área de recepção de amostras deve estar o mais perto possível da sala de processamento;
- Deve existir uma área adequada para a preparação de esfregaços ou preparação da amostra para inoculação no cartucho do Xpert. Se possível deve-se equipar a sala com Cabine de Segurança Biológica (CSB) ou estação de trabalho ventilada.
- Deve existir áreas para procedimentos administrativos e armazenamento do material;
- Possuir corrente eléctrica estável e ar condicionado (obrigatório para Xpert);
- Ter fluxo unidirecional do ar, isto é, sala arejada com janelas que possibilitam a renovação natural do ar e a entrada da luz solar (figura 1);

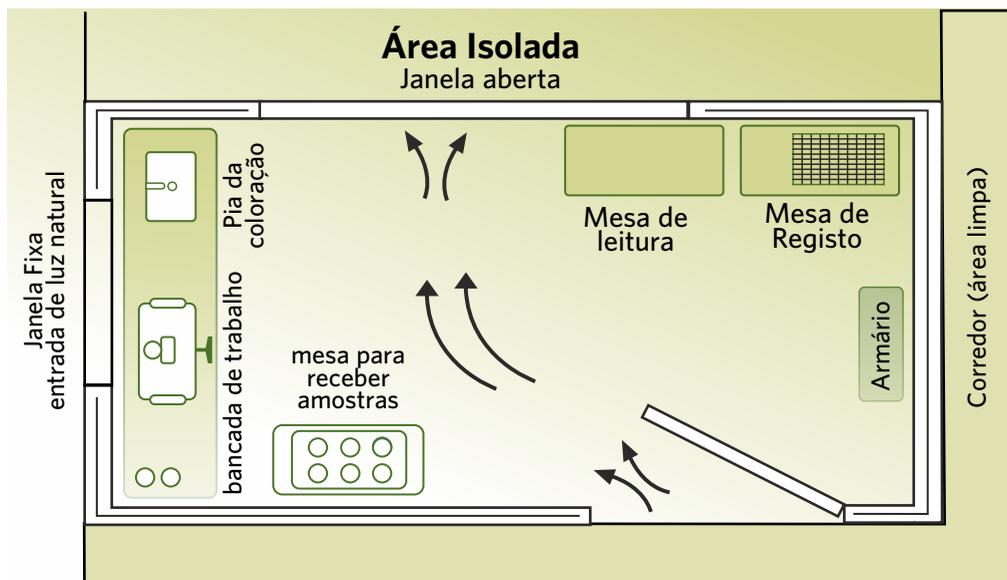


Figura 1. Planta de um laboratório de baciloscopia e Xpert mostrando o fluxo unidirecional de ar.

1.1.2. Equipamento de Protecção Individual (EPI)

O uso de EPI é de carácter obrigatório nos laboratórios e em outras áreas que também oferecem riscos. Fazem parte dos EPI's as batas, luvas, respiradores N95, touca, calçado fechado e óculos de protecção.

a) Batas de Laboratório

As batas devem cumprir com os seguintes critérios:

- Mangas compridas com punho elástico para melhor acomodação das luvas;
- Cumprimento abaixo dos joelhos;
- Algodão ou tecido não inflamável;
- Uso exclusivo e obrigatório em áreas laboratoriais, não podendo ser usada em áreas de convívio, administrativas ou na rua;
- As batas devem ser lavadas periodicamente após desinfeção em hipoclorito de sódio (javel).

b) Respiradores N95, N99 ou N100

- Os respiradores N95, N99 e N100 têm a capacidade de filtrar partículas menores do que 3 micrómetros e devem ser obrigatórias nos procedimentos com amostras suspeitas da presença do *Mycobacterium tuberculosis*.
- Devem ser confortáveis, ter boa adaptação ao rosto, permitir a respiração normal, não irritar a pele e não ter cheiro.



Figura 2. Bata de uso laboratorial



Figura 3. Respirador N95 para uso laboratorial

Uso de respiradores N95, N99 ou N100

É recomendado pelo fabricante que o respirador seja colocado de forma que os dois elásticos fiquem afixados correctamente e sem dobras, um fixado na parte superior da cabeça e outro na parte inferior, na altura do pescoço, sem apertar as orelhas. A sua colocação deve obedecer os seguintes passos:



1
Posicione o respirador na sua mão com a parte nasal nos seus dedos



2
Coloque o respirador na sua face permitindo que os elásticos fiquem por baixo de suas mãos e com a parte de ajuste nasal para cima.



3
O elástico superior deve ficar por cima e por trás da cabeça. O elástico inferior deve ficar por baixo das orelhas. Não cruze os elásticos.



4
Coloque as pontas dos dedos das duas mãos na parte metálica por forma a ajustar o respirador de acordo com o formato do seu nariz.

De salientar que, devido a diversidade no formato do rosto é importante que o respirador encaixe perfeitamente na cara do técnico, não permitindo que haja abertura para a entrada de partículas, névoas ou vapores.

Cuidados no uso dos respiradores

- Não colocar o respirador no pescoço quando o mesmo não está em uso;
- Guardar o respirador em local seco, fresco e livre de humidade;
- Não dobrar e nem amarrotar o respirador;
- Manusear o respirador com cuidado evitando tocar a parte interior, pois, após o uso no processamento de amostras, a parte exterior é considerada suja.
- Trocar o respirador de acordo com as recomendações do fabricante. No entanto, devido a insuficiência, recomenda-se a substituição do mesmo semanalmente, ou sempre que estiver húmida ou com elástico flácido;
- Trocar o respirador sempre que espirrar ou tossir;
- Não lavar os respiradores.

d) Luvas

A manipulação de amostras deve ser feita usando:

- Luvas de latex
- "Descartáveis, podendo conter ou não o pó.

Como calçar as luvas

- Certificar-se de que tem as mãos limpas (lavando-as) e secas;
- Dispor de luvas com tamanho adequado para as mãos;
- Inserir as mãos dentro de cada luva;
- Entrelaçar os dedos de ambas as mãos para assegurar um ajuste confortável;
- Ajustar os dedos conforme necessário para torná-la confortável.



Figura 4. Ilustração de uma luva bem ajustada (imagem à esquerda) e de uma luva com ajuste incorrecto (imagem à direita).



Legenda:

1. Pegue uma luva próximo ao seu punho em direção à ponta dos seus dedos até que ela se dobre
2. Pegue cuidadosamente a dobra e puxe em direção às pontas dos seus dedos. À medida que puxar estará colocando a luva ao avesso
3. Continue puxando a dobra até que a luva esteja quase que totalmente removida. Continue a segurar a luva removida e a seguir, remova completamente a sua mão.
4. Escorregue o dedo indicador da mão sem luva por baixo da luva que permanece. Continue a inserir seu dedo em direção à sua ponta até que quase metade do dedo esteja sob a luva
5. Gire o seu dedo a 180° e puxe a luva ao avesso em direção a ponta dos seus dedos. A medida que fizer isso, a primeira luva será contida na segunda luva. O lado interno da segunda luva também, será virada ao avesso.
6. Pegue as luvas firmemente por meio da superfície não contaminada (o lado que estava inicialmente tocando sua mão). Liberte totalmente o contacto com a primeira luva removida. A seguir retire sua segunda mão do contacto com as luvas descartando-as adequadamente.

e) Toucas ou protectores de cabelo (uso opcional)

- As toucas devem ser descartáveis, utilizadas para a protecção dos cabelos da contaminação por aerossóis, salpicos e produtos químicos;
- No caso de cabelos longos, estes devem estar presos;
- A touca deve cobrir todo o cabelo e orelhas;
- Para retirar a touca, puxe-a pela parte superior central e descarte-a no recipiente apropriado;
- A touca deve ser trocada sempre que necessário durante os procedimentos laboratoriais.



Figura 5. Ilustração de uma touca bem ajustada.

f) Óculos de protecção (uso opcional)

- Utilizados para a protecção dos olhos durante a preparação de reagentes, procedimentos que podem produzir salpicos, derrames e aerossóis;
- Devem ser de fácil colocação e resistentes aos líquidos;
- Devem, preferencialmente, proteger as laterais da face, ter boa adaptação ao rosto garantindo, inclusive, o uso de óculos graduados;
- Devem ser higienizados com água e sabão regularmente.



Figura 6. Ilustração de óculos de protecção.

g) Calçados

- Os calçados devem ser fechados, impermeáveis, confortáveis e de sola rasa anti-derrapante.



Figura7. Ilustração de um calçado de laboratório.

1.1.3. Procedimento em caso de acidentes

Durante a realização de actividades laboratoriais é importante que o técnico assegure a pronta actuação para a desinfecção e limpeza de locais com derrames de materiais biológicos. Para garantir uma resposta rápida, o laboratório deve possuir um kit com elementos essenciais para a limpeza e desinfecção do derrame (kit de primeiros socorros e kit de derrames).

Conteúdo do Kit de derrames

Cada laboratório deve possuir um plano e kit de resposta aos acidentes com material biológico em superfícies diversas dentro e fora do laboratório. Cada kit deve conter:

- Papel-toalha, tecido de algodão ou outro material absorvente, como por exemplo, gaze;
- Luvas;
- Bata descartável ou avental;
- Respirador N95;
- Sacos plásticos de lixo, autoclaváveis;
- Sinalização com o dizer: "Perigo, não entre, ocorreu um derrame!"
- Pinças.

Outros materiais/soluções que devem estar disponíveis no laboratório:

- Balde de lixo para material perfuro-cortante;
- Solução de hipoclorito de Sódio a 5% e álcool a 70% (vide no anexo 1)

1.2. Derrame em laboratórios sem Cabine de Segurança Biológica (CSB)

O derrame de material infeccioso em laboratórios sem CSB é considerado uma ocorrência grave. Neste caso, prossiga com as instruções abaixo:

1. Continuar usando os EPI's (respirador N95, batas, luvas, e calçados fechados);
2. Não entrar em pânico;
3. Solicitar as pessoas que estiverem na sala para sair imediatamente;
4. Prender a respiração o mais possível;
5. Colocar a sinalização com o dizer: "Perigo, não entre, ocorreu um derrame!" que se encontra dentro do kit.
6. Abandonar a sala imediatamente por, no mínimo, 30 minutos, para permitir que partículas mais pesadas dos aerossóis e assentem ao chão;
7. Avisar de imediato o gestor do laboratório e de biossegurança e registar o acidente;
8. Passado 30 minutos, colocar os EPI's;
9. Entrar na sala e usar o kit de derrame disponível;
10. Cobrir o material derramado com papel toalha ou tecido de algodão/material absorvente;
11. Colocar o hipoclorito de sódio a 5% ou outro desinfectante apropriado sob o papel toalha e superfícies próximas começando de fora para o centro;
12. Permitir um tempo suficiente para o desinfectante actuar (30 minutos) antes de retirar o papel toalha e resto de material para descarte no saco autoclavável. Se o derrame envolver vidraria partida use uma pinça e descarte no recipiente para perfuro-cortantes disponível na bancada. Embeber o papel toalha com desinfectante para limpar os pedaços pequenos de vidro;
13. Limpar e desinfectar a área de derrame, bancadas e equipamentos próximos.

1.2.1. Derrame em laboratórios com Cabine de Segurança Biológica (CSB)

a) Derrame fora da CSB

Proceder como no ponto 2.3.1. No entanto, deve-se manter a CSB sempre ligada por forma a permitir que partículas mais pesadas dos aerossóis não só se assentem ao chão, mas também sejam removidas pelo sistema de ventilação.

b) Derrame dentro da CSB

Quando ocorre um derrame de material infeccioso dentro de CSB deve iniciar-se imediatamente com o procedimento de limpeza e a CSB deve continuar a funcionar. Proceder da seguinte forma:

1. Colocar um papel toalha sobre a superfície onde ocorreu o derrame e despejar a solução desinfectante sobre ele;
2. Se o derrame atingir as paredes da CSB, limpar as mesmas usando papel toalha humedecido com solução desinfectante;
3. Deixar as áreas afectadas cobertas com desinfectante por 30 minutos a 1 hora;

4. Qualquer equipamento ou material reutilizável deverão ser limpos com o mesmo desinfetante;
5. Equipamento eléctrico deve ser verificado cuidadosamente antes de ser usado, verifique a integridade dos interruptores.
6. Cuidadosamente, retirar o material contaminado e colocar no saco autoclavável. Em caso de material perfuro-cortante colocar no recipiente resistente a perfurações para ser descartado.

1.3. Descarte de material e resíduos

O descarte adequado de resíduos laboratoriais tem em vista salvaguardar a saúde e segurança dos trabalhadores e do público em geral, minimizando o impacto ambiental.

O descarte, transporte e acondicionamento dos resíduos laboratoriais deve ser feito de acordo com o Regulamento sobre Gestão de Lixo Biomédico em Moçambique (Decreto 08/2003, de 18 de Fevereiro) que ressalta que os resíduos laboratoriais devem ser segregados de acordo com o seu nível de risco devendo o laboratório dispor de condições de acondicionamento para as categorias de lixo existentes:

- **Lixo infeccioso:** O lixo infeccioso deve ser colocado em recipiente destinado para tal para posterior autoclavação ou incineração. Em caso de falta de autoclave e incineradora pode-se depositar o lixo no aterro sanitário. O lixo infeccioso reutilizável deve de igual modo ser transportado dentro do saco de autoclave e separado do lixo não reutilizável. Diariamente todo o lixo deve ser retirado das salas.
- **Lixo perfuro-cortantes:** O lixo cortante e/ou perfurante deverá ser descartado em recipientes com paredes fortemente rígidas, etiquetadas como "Lixo cortante e/ou perfurante" e com o símbolo de risco biológico. Estes recipientes para perfuro-cortantes dispõem de um sinal que representa a capacidade máxima após o qual não deverá mais nada ser depositado.

NOTA: O lixo infeccioso e/ou lixo perfuro-cortante a descartar não deve ultrapassar $\frac{3}{4}$ da capacidade do cesto da autoclave. Nele deve-se adicionar cerca de 250 ml de água para garantir que haja vapor durante o ciclo de autoclavação. Quaisquer derrames de lixo infeccioso, deverá ser contido dentro do recipiente de modo a permitir uma lavagem e desinfecção fácil.

- **Lixo comum:** O lixo comum deverá ser colocado em sacos plásticos que podem ser transparentes e depositado em qualquer contentor ou recipiente adequado para o efeito, não necessitando de autoclavação antes da remoção.

Anexos

Anexo 1: Preparação de Reagentes

1.1. Desinfectantes

a) Álcool etílico a 70%

1. Prepare 1000 ml de álcool a 70% a partir de um frasco comercial a 96% usando a seguinte fórmula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$, isto é, $70\% \times 1000 \text{ ml} = 96\% \times V2$. Neste caso, $V2 = (70\% \times 1000) / 96\%$. Então $V2 = 729 \text{ ml}$
2. Meça a quantidade de álcool calculada numa proveta e transfira para o balão volumétrico;
3. Acrescente ao álcool a quantidade de água ($1000 - 729 = 271$) necessária até perfazer 1000ml da solução final. Misture a solução e coloque um rótulo de identificação no frasco conforme figura:

_____	<input type="checkbox"/> Base
_____	<input type="checkbox"/> Ácido
_____	<input type="checkbox"/> Sal
_____	<input type="checkbox"/> Solvente
_____	<input type="checkbox"/> Irritante
_____	<input type="checkbox"/> Tóxico
_____	<input type="checkbox"/> Inflamável
_____	<input type="checkbox"/> Corrosivo

b) Hipoclorito de sódio a 0.5 e 5%

O hipoclorito de sódio comercial (javel) geralmente contém 4 a 5% de clorina. Calcular a quantidade de água e de hipoclorito que deve ser misturada usando a fórmula descrita no procedimento experimental do álcool a 70%, isto é, $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

Por exemplo, calcular a quantidade de solução de hipoclorito de sódio a 0.5% tendo em conta que a concentração de clorina comercial é de 5% e o volume final desejado é de 1litro.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0.5\% \times 1000 \text{ ml} = 5\% \times V2$$

$$V2 = 100 \text{ ml}$$

1. Medir 100ml de hipoclorito com a proveta e transferir para o balão volumétrico;
2. Medir a quantidade de água destilada necessária (900ml) e adicionar ao volume de hipoclorito de sódio.
3. Colocar um rótulo de identificação conforme descrito para o álcool a 70% e armazenar ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após a preparação, a solução de hipoclorito é estável por uma semana.

The background is a solid green color with a pattern of overlapping, semi-transparent squares in various shades of green, creating a textured, geometric effect.

AMOSTRAS CLÍNICAS



2. AMOSTRAS CLÍNICAS

2.1. Tipo de amostras para o diagnóstico da tuberculose

Para que o laboratório possa emitir resultados fiáveis não só necessita de realizar as técnicas correctamente, como também deve receber amostras com boa qualidade. Entende-se como amostra de boa qualidade, aquela que provém do local da lesão (órgão infectado), obtida em quantidade suficiente, colocada em recipientes adequado, bem identificada, conservada e transportada ao laboratório de forma adequada.

As amostras podem ser classificadas em pulmonares, quando originam de órgãos do sistema respiratório, e extrapulmonares, quando o órgão de origem não pertence ao sistema respiratório.

- Amostras pulmonares: expectoração, lavado gástrico, lavado brônquico (ou bronco-alveolar).
- Amostras extrapulmonares: líquido pleural, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido ascítico, urina, aspirados de gânglios, pús de cavidades abertas, biópsias e fezes (em casos de suspeita de TB intestinal).

A amostra mais usada no diagnóstico da tuberculose é a expectoração porque provém dos pulmões, que são os órgãos frequentemente afectados.

ATENÇÃO: Todas amostras extrapulmonares podem ser submetidas a baciloscopia e Xpert, mas a realização da cultura é obrigatória por ser um método que fluidifica a amostra e concentra os bacilos da centrifugação. Desta forma, para aumentar a sensibilidade da baciloscopia e Xpert, as amostras extrapulmonares devem ser submetidas primeiro à cultura.

2.2. Colheita, conservação e transporte de amostras ao laboratório

As amostras clínicas enviadas ao laboratório para o diagnóstico de micobactérias devem cumprir uma série de condições das quais dependem a qualidade e eficácia dos resultados dos exames, tais como, preenchimento correcto da requisição, selecção do tipo de amostra mais representativa, cuidados na colheita, transporte e armazenamento desta. A seguir são descritas as condições de colheita, transporte e estabilidade da expectoração por ser a amostra comumente usada no diagnóstico da TB pulmonar. O anexo 2 descreve as condições de colheita, transporte e estabilidade das outras amostras pulmonares e extrapulmonares.

2.2.1. Colheita de expectoração

a) Escarrador

- Devem ser limpos e transparentes
- Ter boca suficientemente larga para permitir que o paciente coloque facilmente a expectoração sem contaminar o exterior
- Ter tampa de rosca
- Devem ser de material resistente para evitar amolgamento e não permitir vazamento durante o transporte
- Devem ser descartáveis e inflamáveis para facilitar a sua destruição
- As paredes devem ser facilmente rotuláveis para permitir uma identificação permanente.



Figura 8. Ilustração de um escarrador.

b) Quantidade de amostras

Devem ser colhidas 2 (duas) amostras de expectoração por cada paciente para aumentar a probabilidade de se obter um resultado positivo. A 1ª amostra deve ser colhida na Unidade Sanitária durante a consulta. Se a Unidade Sanitária não dispor de local apropriado para a colheita o paciente deve colher em casa, preferencialmente a noite, antes do jantar e a 2ª amostra no dia seguinte de manhã, ao acordar.

Para a 1ª amostra não é necessário que o paciente esteja em jejum, porém, é importante que a boca esteja limpa e sem resíduos alimentares, enquanto que para a 2ª amostra o paciente deve estar em jejum, com a boca limpa (antes de escovar os dentes). Colher as amostras de preferência ao ar livre.

c) Orientação para colheita de expectoração

É fundamental que o técnico trate o paciente pelo nome, o cumprimente, se concentre e mantenha contacto visual e seja receptivo sempre que solicitado. Deve ainda, explicar a importância do exame para o paciente, utilizando termos claros e de fácil entendimento.

Peça ao paciente para levar 2 amostras ao laboratório. Estas deverão ser colhidas da seguinte maneira:

1ª Amostra (no dia da consulta)



1

Certifique-se que no seu escarrador está escrito o seu nome, data e hora da colheita



2

Lave a boca bochechando apenas com água (se tiver placa dentária tire-a



3

Relaxe e leve o tempo necessário para colher a sua expectoração



4

Num local ao ar livre, certifique-se de que ninguém esteja por perto. Inspire (meta o ar para dentro) profundamente e suspenda a respiração por alguns segundos e expire (tire o ar para fora)



5

Inspire e expire por mais 2 vezes. A 3ª vez, force a tosse até a retirada da expectoração do peito para a boca



6

Coloque a amostra directamente no escarrador

2ª Amostra em Casa

1. Antes de dormir, beba água e durma sem almofada.
2. Ao acordar, não coma, não beba, não fume e nem escove os dentes antes de colher a amostra.
3. Siga os passos de 1 à 9 da orientação da colheita da primeira amostra de expectoração.
4. Conserve a amostra num local seco e fresco, fora do alcance das crianças ao abrigo da luz solar (não coloque na geleira ou congelador).

2.2.2. Conservação de Amostras

As amostras devem ser processadas de imediato, após receção no laboratório. Se o processamento não for possível de imediato, as amostras devem ser conservadas numa geleira de 2-8°C. Nestas condições as amostras devem ser processadas para baciloscopia e Xpert dentro de 10 dias.

Em caso de não haver condições para refrigeração, podem ser conservadas num local seco e fresco protegido da luz solar. Nestas condições as amostras devem ser processadas para baciloscopia e Xpert dentro de 4 dias.

2.2.3. Empacotamento e transporte da amostra ao laboratório

a. De casa à unidade sanitária

O paciente deve assegurar que os escarradores estão bem fechados para evitar derrame. De seguida, sobrepor os escarradores verticalmente (com as tampas voltadas para cima) e envolvê-los com material descartável que impeça a exposição da amostra a luz solar, como por exemplo, papel ou saco plástico escuro. Não juntar os escarradores com a requisição e levá-los de imediato ao laboratório. Durante o transporte, não agitar os escarradores contendo a amostra.

b. Referenciamento de amostras

As amostras biológicas a serem transportadas, quer por via terrestre ou aérea, devem ser empacotadas e acondicionadas em recipientes apropriados como por exemplo caixas térmicas (colmans) com separadores internos, se disponível. Ao manusear a amostra use sempre equipamento de protecção individual.

As amostras passam pelo procedimento seguinte:



- 1 Envolve o escarrador/frasco com material absorvente (por exemplo, papel higiénico) e cole com fita adesiva, para o proteger e absorver de qualquer vazamento;



- 2 Coloque as amostras num plástico e feche-o;



- 3 Coloque o plástico numa caixa térmica com acumuladores;



- 4 Feche a caixa térmica com fita adesiva de uma forma segura;



5

Coloque as requisições dentro de um plástico e coloque-o fora na caixa térmica;

- Escreva o nome do destinatário e o endereço do laboratório de referência na caixa térmica;
- Cole uma etiqueta com setas ascendentes na caixa térmica;
- Antes de enviar as amostras verifique o seguinte:
- O número de escarradores/frascos na caixa é igual ao número de requisições;
- O número de identificação de cada escarrador corresponde ao número escrito na requisição;
- As requisições contêm toda a informação/dados dos pacientes;
- A data de envio e o nome da unidade sanitária estão escritos.
- Transportar a caixa térmica na posição vertical.
- Escrever na caixa: "MANUSEIE COM CUIDADO (Substâncias potencialmente infecciosas) e/ou etiqueta "FRAGIL";
- Preencher correctamente o protocolo de envio de amostras.

2.3. Anexos

Anexo 2. Condições de colheita, transporte e estabilidade das amostras pulmonares e extrapulmonares.

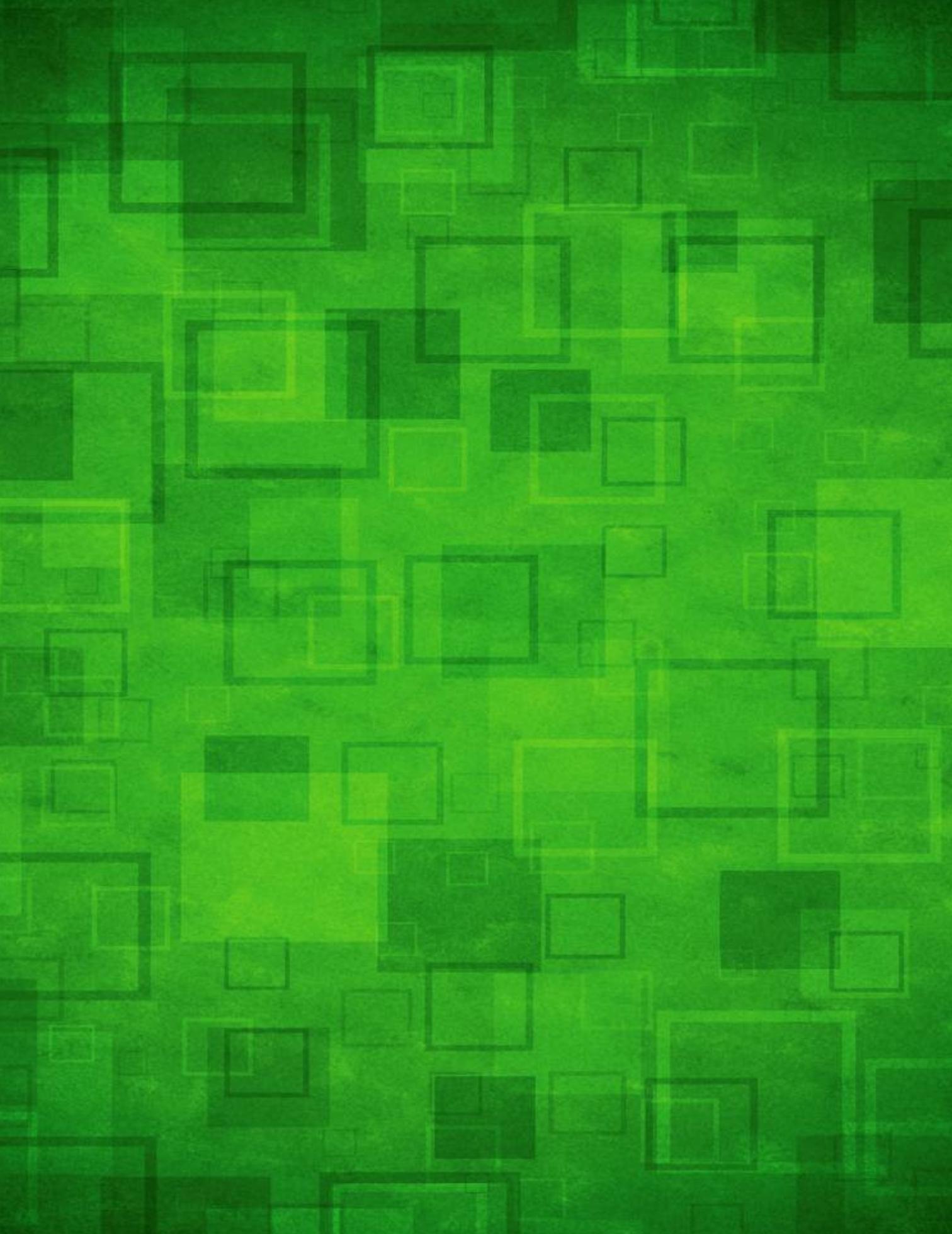
Tipo de TB e análises/métodos	Material de Colheita / Amostra	Transporte	Estabilidade
<p>TB pulmonar - Baciloscopia (BK), Exame Cultural em meio sólido de Lowenstein Jensen e meio líquido - MGIT; GeneXpert (PCRGX), Teste de Sensibilidade as Drogas (TSA), Line Probe Assay (LPA).</p>	<p>Frasco plástico, de boca larga, com 50 mm de diâmetro: Expectoração; Volume 5 a 10 ml. Colher em dois dias consecutivos; a primeira antes do jantar e a segunda no dia seguinte ao acordar. Lavar a boca e em local arejado abrir o escarador, forçar a tosse, inspirar profundamente, prender a respiração e escarrar no frasco. Registrar a hora de cada colheita.</p>	<p>1 dia, temperatura ambiente, ao abrigo da luz</p> <p>1 dia da província para LNRT, 2 a 8°C</p>	<p>4 dias e mantido a 2 a 8°C, manter ao abrigo da luz em local fresco</p>
	<p>Frasco plástico, de boca larga, com 50 mm de diâmetro: Expectoração induzida; Volume 5 a 10 ml. Devem ser bebidos muitos líquidos, de preferência água, no dia anterior à colheita. Sobre orientação médica, usar um nebulizador ultra-sônico com solução salina e hipertônica a 3% durante 5 a 20 minutos. Deve ser colhido em condições de biossegurança para evitar contaminação do ambiente.</p>	<p>1 dia, temperatura ambiente, ao abrigo da luz</p> <p>1 dia da província para LNRT, 2 a 8°C</p>	<p>4 dias e mantido a 2 a 8°C, manter ao abrigo da luz em local fresco.</p>
	<p>Frasco plástico, de boca larga, com 50 mm de diâmetro: Lavado gástrico, Volume 50 ml. Requer hospitalização. Em jejum de 8 a 10 horas antes, logo de manhã, antes de levantar, realizado com sonda nasogástrica fina, introduzida pelo nariz ou boca, injetar 10 a 15 ml de soro fisiológico, esperar 30 min e fazer a lavagem.</p>	<p>1 hora, temperatura ambiente</p>	<p>4 horas e mantido a 2 a 8°C. (deve ser entregue no dia da colheita)</p>

Tipo de TB e análises/métodos	Material de Colheita / Amostra	Transporte	Estabilidade
	<p>Frasco estéril: Lavado brônquico, 5 mL. Sobre orientação médica, uso do broncofibroscópio, não usar substâncias anestésicas pois são letais para a micobactéria. A sala deve comportar condições de biossegurança.</p>	<p>≤4 horas, temperatura ambiente, ao abrigo da luz</p>	<p>≤ 24 horas, 2-8°C.</p>
<p>Extra pulmonares Baciloscopia (BK), Exame Cultural (meio sólido de Lowenstein Jensen e meio líquido - MGIT); Teste de Sensibilidade às Drogas (TSA), Line Probe Assay (LPA).</p>	<p>Frasco estéril: LCR, volume mínimo de 5 ml. Realizado por procedimento médico, recomendado jejum, feito por punção lombar.</p>	<p>≤15 min, temperatura ambiente</p>	<p>≤ 24 horas, temperatura ambiente.</p>
	<p>Frasco estéril: Líquido pleural, sinovial, peritonal e outros. Volume mínimo 10 mL. Realizado por procedimento médico, punção pela via percutânea ou cirúrgica, não usar corantes ou fixador.</p>	<p>≤ 15 min, temperatura ambiente</p>	<p>≤ 15 min, temperatura ambiente 24 horas, temperatura ambiente.</p>
	<p>Recomenda-se inocular diretamente em frasco de meio de cultura ou frasco estéril: Medula óssea, volume mínimo 10 mL. Realizado por procedimento médico, com anticoagulante. Punção venosa, não usar EDTA como anticoagulante.</p>	<p>≤ 2 horas, temperatura ambiente</p>	<p>≤ 24 horas, temperatura ambiente.</p>

Tipo de TB e análises/métodos	Material de Colheita / Amostra	Transporte	Estabilidade
	<p>Frasco estéril, zaragatoa imersa em água destilada ou solução salina: Pús e Secreções. De cavidades fechadas por punção, cavidades abertas com zaragatoa. Pode ser feito uma aspiração com agulha fina.</p>	<p>≤ 2 horas, temperatura ambiente</p>	<p>≤ 24 horas, temperatura ambiente.</p>
	<p>Frasco estéril de boca larga com tampa de rosca: Urina, volume mínimo de 40 ml. Após a higiene com água e sabão neutro, colher para 2 tubos Falcon e no máximo de 4 tubos, em 2 dias consecutivos, toda a 1ª micção da manhã. Cada amostra colhida deve ser entregue no laboratório no dia da colheita, sendo que a segunda amostra deve ser entregue no dia da marcação para a entrega do resultado da baciloscopia da primeira amostra.</p>	<p>≤ 12 horas, temperatura ambiente</p>	<p>≤ 4 horas ou centrifugar e neutralizar o precipitado, conservar de 2 a 8°C.</p>
	<p>Frasco de boca larga sem conservante: Fezes. 25g, correspondente a uma pequena colher. Colher de preferência antes da medicação</p>	<p>≤ 1 hora, temperatura ambiente</p>	<p>≤ 24 horas, 2 a 8°C</p>

The background is a solid green color with a pattern of overlapping, semi-transparent squares in various shades of green, creating a textured, geometric effect.

BACILOSCOPIA



3. BACILOSCOPIA

A baciloscopia é a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) no esfregaço da amostra através do microscópio. Trata-se de uma técnica simples, de fácil execução, porém de baixa sensibilidade (25 a 65%) se comparado com a cultura, pois o número mínimo de bacilos para que se tenha um resultado positivo varia de 5000 a 10000 bacilos/ml da amostra.

A realização da baciloscopia compreende 3 passos importantes: execução do esfregaço, coloração do esfregaço e leitura microscópica do esfregaço corado. A execução do esfregaço pode ser feita directamente a partir da amostra ou após a amostra passar pelo procedimento de descontaminação, fluidificação e concentração por agentes químicos. Este manual descreve a baciloscopia directa usando a amostra de expectoração.

3.1. Recepção das amostras no laboratório

A recepção é uma componente da fase pré-analítica, na qual ocorre aceitação ou rejeição de amostras, registo da amostra do paciente no livro de registo fornecido pelo PNCT, rotulagem do número de registo do laboratório na requisição e nos escarradores contendo amostras.

Os critérios de rejeição das amostras podem ser:

- Amostras demarradas,
- Escarrador sem amostra ou amostra sem requisição
- Discrepância entre os dados da requisição e amostra/escarrador
- Discordância do tipo de amostra indicada na requisição com a amostra recebida.

3.2. Material necessário para realização da baciloscopia

- Lápis de diamante (para lâminas lisas) ou de carvão (para lâminas esmeriladas/foscas)
- Tabuleiro;
- Papel toalha, papel de caqui ou gaze;
- Pinças;
- Lamparina ou bico de bunsen;
- Lâminas novas, limpas e desengorduradas em álcool absoluto;
- Palitos de madeira (palitos da zaragatoas) ou ansas plásticas descartáveis ou ansas metálicas com diâmetro de 3 mm;
- Recipiente para descarte de material;
- Recipiente contendo hipoclorito de sódio a 0.5% para o descarte de ansas ou palitos usados;
- Frasco com areia e álcool a 70% para a previa descontaminação de ansas metálicas;

3.3. Reagentes necessários para a realização da baciloscopia

- Hipoclorito de sódio a 0.5%
- Álcool a 70%
- Soluções de coloração (dependendo do método - Ziehl Neelsen ou Auramina O)
- Água.

Nos anexo 3 e 3.1. estão descritos a preparação dos reagentes para execução da técnica de Ziehl Neelsen e Fluorescência.

3.4. Organização da área de trabalho

- Descontaminar a bancada ou estação de trabalho com solução de hipoclorito de sódio a 0.5% e de seguida passar álcool a 70%;
- Colocar por cima da bancada ou dentro da estação de trabalho todo o material que vai usar durante a execução do esfregaço.

3.5. Identificação das lâminas

- Com um lápis de carvão (se a lâmina for esmerilada/fosca) ou lápis de diamante (se lâmina for lisa), escrever na extremidade da lâmina o número do laboratório atribuído na recepção da amostra no laboratório.
- Certificar que o número de registo na lâmina corresponde com o números no escarrador. Se o paciente trazer duas amostras, usar uma única lâmina para cada amostra do paciente, isto é, para primeira amostra colocar numa lâmina o número com barra 1 e para a segunda amostra colocar noutra lâmina o número com barra 2, como mostra a figura 9.



Figura 9. Exemplo de enumeração das lâmina microscópicas por lápis de diamante para a realização da baciloscopia. Neste caso o paciente entregou ao laboratório duas amostras: a lâmina 22/1 é para a primeira amostra e a lâmina 22/2 é para a segunda amostra.

3.6. Execução do esfregaço

1. Se usar zaragatoa ou palitos de madeira, partir este ao meio e proceder o ponto 4. Se usar ansa metálica, mergulhar a ansa no frasco com areia embebida em álcool a 70%.
2. Retirar a ansa da areia em álcool a 70% e esterilizar na lamparina ou bico de bunsen (até a ansa tornar-se vermelha);
3. Deixar arrefecer a ansa (não soprar) para evitar a criação de aerossóis;
4. Introduzir a ansa/zaragatoa no escarrador e colher a parte da amostra mais mucopurulenta;
5. Colocar a amostra no centro da lâmina;
6. Fazer o esfregaço no centro da lâmina cobrindo uma área de 2x1 cm;
7. Passar a ansa no frasco contendo areia com álcool para remover resíduos de expectoração e esterilizar de novo na lamparina ou bico de bunsen (não aplicável aquando do uso da zaragatoa).
8. Realizar os mesmos procedimentos para as restantes amostras.
9. Conservar a ansa após esterilização na lamparina/bico de bunsen. No caso do uso da zaragatoa, descartá-la no recipiente de descarte contendo hipoclorito de sódio a 0.5%.
10. Deixar a lâmina secar a temperatura ambiente (não usar a chama nem colocar ao sol).

3.7. Fixação do esfregaço

1. Após a secagem da lâmina a temperatura ambiente, pegar na extremidade de cada lâmina com ajuda de uma pinça (a parte que contém o esfregaço deve estar voltada para cima);
2. Passar rapidamente a lâmina, 3 vezes, pela chama da lamparina ou bico de Bunsen.

NOTA: Não aquecer a lamina demasiadamente de forma queimar os bacilos

3.8. Coloração do esfregaço, leitura e interpretação de resultados

Para leitura e interpretação do resultado, o esfregaço deve passar pelo processo de coloração. Várias são os métodos de coloração do esfregaço. Este manual descreve os métodos padronizados de Ziehl-Neelsen e Auramina O (Fluorescência).

3.8.1. Coloração pelo método de Ziehl-Neelsen

O princípio da coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Neelsen baseia-se na capacidade que as micobactérias têm de reter a fucsina após coloração e não se deixar descolorar pela acção do álcool-ácido, permitindo assim a observação de bacilos avermelhados na microscopia óptica.

a) Procedimento de coloração

1. Colocar as lâminas no suporte de coloração com o esfregaço virado para cima, de acordo com o número de ordem de registo, sem encostar umas as outras (corar, no máximo, 12 lâminas de cada vez);
2. Incluir as lâminas de controlo positivo e negativo no lote das lâminas por corar (ver capítulo 5);
3. Cobrir as lâminas na totalidade com fucsina filtrada a 1%;
4. Aquecer as lâminas lentamente, passando por baixo das lâminas uma haste em chama, até a emissão de vapor (fumo da fucsina), não deixando a fucsina ferver;
5. Deixar actuar por 5-7 minutos;
6. Inclinar as lâminas para derramar a fucsina e com ajuda de um recipiente, lavar, deitando lentamente, água corrente sobre as lâminas. A água deve ser deitada sobre o número inscrito de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar toda fucsina;
7. Manter as lâminas inclinadas para remover o excesso de água;
8. Cobrir as lâminas com a solução álcool-ácido a 3% ou ácido sulfúrico a 20%;
9. Deixar actuar durante 2 minutos;
10. Lavar com água corrente como descrito em 6. Repetir o passo 8 se necessário;
11. Cobrir as lâminas com azul de metileno a 0.1%;
12. Deixar actuar durante 2-3 minutos;
13. Lavar com água corrente como descrito em 6;
14. Com o papel toalha ou gaze embebido em álcool, limpar a lâmina na parte oposta ao esfregaço para remover o fumo e excesso de corantes;
15. Deixar secar os esfregaços ao ar livre sem colocá-los ao sol ou qualquer tipo de aquecimento.

b) Leitura microscópica de lâminas coradas pelo método de Ziehl-Neelsen

1. Limpar bem as objectivas do microscópio antes de o ligar e registar no formulário do anexo 4
2. Colocar a lâmina de controlo positivo na platina, focar com objectiva de 10x e ajustar com ajuda do parafuso macrométrico e micrométrico;
3. Quando visualizar a imagem do esfregaço, colocar 1 gota de óleo de imersão sobre a lâmina;
4. Usar a objectiva de 100x e ajustar até o aparecimento de uma imagem nítida;

Na coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, os bacilos aparecem em forma de bastão, avermelhados, por vezes isolados ou agrupados ou ainda fragmentados (em pacientes em tratamento), com um fundo azul (figura 4).

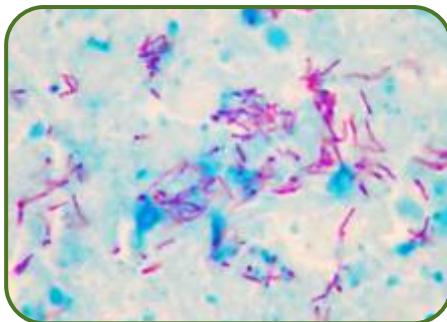


Figura 10. Bacilo álcool-ácido-resistente observado ao microscópio óptico após coloração de Ziehl-Neelsen.

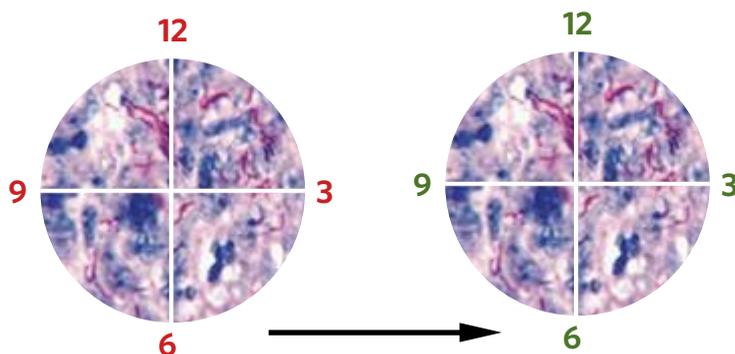


Figura 12. Ilustração da mudança de campo durante a leitura microscópica

c) Interpretação dos resultados no método de Ziehl-Neelsen

Fazer o somatório dos bacilos observados e dividir pelo número total de campos observados segundo a escala de classificação da OMS/UICTDR para interpretação dos resultados (tabela 1).

Tabela 1. Escala de Classificação da OMS/UICTDR para leitura de lâminas pelo método de Ziehl-Neelsen

RESULTADO	Sistema Microscópio Usado
	Luz branca (100x10=1000 Ampliação)
Negativo	Zero BAAR/100 Campos
Contagem exacta	1-9 BAAR/100 Campos
+	10-99 BAAR/100 Campos
++	1-10 BAAR por campo/50 Campos
+++	>10 BAAR por campo/20 Campos

NOTA: O mesmo esfregaço deve ser observado por dois técnicos.

3.8.2. Coloração pelo método de Auramina O (fluorescência)

O princípio da coloração do esfregaço pelo método de Auramina O ou baseia-se na capacidade das micobactéria sem reter a auramina O após coloração e não se deixar descorar pela acção do álcool-ácido, permitindo assim a observação de bacilos fluorescentes na microscopia de fluorescência.

a) Procedimento de coloração pelo método de Auramina O

1. Colocar as lâminas no suporte de coloração com o esfregão virado para cima, de acordo com o número de ordem de registo, sem encostar umas as outras;
2. Incluir as lâminas de controlo positivo e negativo no lote das lâminas por corar;
3. Cobrir todo o esfregão de cada uma das lâminas com a solução de auramina fenificada a 0.1%;
4. Deixar actuar por 20 minutos;
5. Após os 20 minutos, inclinar as lâminas para derramar a auramina fenificada e com ajuda de um recipiente, lavar, deitando lentamente, água corrente sobre as lâminas. A água deve ser deitada sobre o número inscrito de cada lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregão até eliminar toda auramina;
6. Manter as lâminas inclinadas para remover o excesso de água;
7. Cobrir completamente a lâmina com a solução descorante de álcool-ácido a 0.5%;
8. Deixar actuar por 2 minutos;
9. Lavar com água corrente como descrito em 5. Caso a lamina não descore completamente, repetir o passo 7, deixando actuar por 30 segundos;
10. Cobrir o esfregão de cada uma das lâminas com a solução de permanganato de Potássio a 0,5%;
11. Deixar actuar por 1 minuto;
12. Lavar com água corrente como descrito em 5.
13. Com o papel toalha ou gaze embebido em álcool, limpar a lâmina na parte oposta ao esfregão para remover o fumo e excesso de corantes;
14. Deixar secar os esfregaços ao ar livre sem colocá-los ao sol ou qualquer tipo de aquecimento;
15. Manter as lâminas coradas no escuro ou ao abrigo da luz e fazer a leitura logo que possível pois a fluorescência desaparece rapidamente quando exposto à luz.

b) Leitura microscópica pelo método de fluorescência

1. Ligar o microscópio iLED de imediato no momento da observação;
2. Girar o revolver de modo que a objectiva de x 20 (ou x 25) esteja na posição da luz;
3. Colocar a lâmina de controlo positivo na platina e mover até posicionar a lâmina na objectiva;
4. Ajustar com o parafuso macrométrico primeiro, e depois pelo parafuso micrométrico, para focar o campo;
5. Verificar se o brilhante amarelo fluorescente do BAAR é claramente visto. Caso contrário, ajustar a lâmpada e/ou a posição do espelho. Verificar se o campo é uniformemente iluminado. Se não, centralizar o diafragma depois fechá-lo parcialmente (aplicável para microscópios de fluorescência, não iLED);

A aparência típica dos BAAR é de bastonetes e delgados, ligeiramente curvos. Ele socorrem isoladamente em pequenos grupos e raramente em grandes aglomerações (figura 13). Com boa coloração, também pode haver artefactos fluorescentes (às vezes verdes), que não têm a forma típica. Formas bacilares não fluorescentes também devem ser consideradas como artefactos.

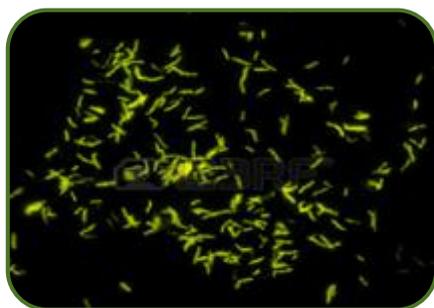


Figura 13. Bacilos álcool-ácido-resistente observado na microscopia de fluorescência

6. Trocar a lâmina do controlo positivo pela primeira de rotina sem mudar o foco ou girar a objectiva. Repetir o procedimento para cada lâmina por examinar;
7. Usando a objectiva de x 20 (ou x 25), fazer a leitura do esfregaço sistematicamente de um lado para o outro como descrito no método de Ziehl-Neelsen.
8. Usar a objectiva de 40 x para observar e registar os resultados como no ponto 7 da leitura microscópica pelo método de Ziehl-Neelsen;
9. O mesmo esfregaço deve ser observado por outro técnico escalado;
10. Armazenar as lâminas na laminoteca em ordem numérica do registo de laboratório.
11. Depois de terminar a leitura, desligar o microscópio, limpar e registar no formulário do anexo 4.

c) Interpretação dos resultados pelo método de fluorescência

Fazer o somatório dos bacilos observados e dividir pelo número total de campos observados. Interpretar os resultados de acordo com a escala de classificação da OMS/UICTDR para emissão dos resultados (tabela 2).

Tabela 2. Escala de Classificação da OMS/UICTDR para leitura de lâminas pelo método de Fluorescência (Auramina O).

RESULTADO	Sistema Microscópio Usado
	Fluorescência (40x10=400 Ampliação)
Negativo	Zero BAAR/40 Campos
Contagem exacta	1-19 BAAR/40 Campos
+	20-199 BAAR/40 Campos
++	5-50 BAAR por campo/50 Campos***
+++	>50 BAAR por campo/20 Campos**

*** Ler 20 campos

** Ler 8 campos

Se houver incerteza quanto à presença de um bacilo na leitura usando a objectiva de 40x, inspecionar a lâmina cuidadosamente, com a objectiva de 100x (use óleo de imersão). Este procedimento é mais eficiente que corar a mesma lâmina pela técnica de Ziehl-Neelsen (às vezes recomendada).

d) Registo dos resultados pelo método de fluorescência

Os resultados das baciloscopias devem ser emitidos dentro de 24 horas. Estes devem ser registados no livro de registo fornecido pelo PNCT, na requisição de pedido médico e no sistema informático, se aplicável.

3.9. Conservação das lâminas

Todas lâminas coradas, tanto pelo método de Ziehl-Neelsen, como pelo método de Auramina O, devem ser bem conservadas em laminotecas ou caixinhas para a avaliação externa de qualidade. As lâminas devem ser armazenadas em ordem de número de registo nas laminotecas. Caso o laboratório não tenha laminotecas suficientes, deve enrolar as lâminas em papel toalha ou caqui, mantendo separação entre elas. Note que o excesso do óleo de imersão nas lâminas coradas por Ziehl-Neelsen devem ser removidas deixando as lâminas viradas para baixo (a parte do esfregão) sob um papel absorvente.

3.10. Controlo e indicadores da qualidade

3.10.1. Controlo interno da qualidade (CQI)

Para a baciloscopia é usado na rotina um controlo positivo e outro negativo. Estes devem ser usados sempre que se fizer a coloração de lâminas.

a) Preparação das lâminas do controlo interno da qualidade

1. Seleccionar amostras de expectoração da sua rotina com resultados conhecidos: para CQI positivo use amostras com resultado de 1+ ou 2+ para BAAR e para CQI negativo use amostras negativas para BAAR;
2. Identificar várias lâminas como CQI positivo e várias como CQI negativa;
3. Preparar e fixar os esfregaços;
4. Colocar e conservar os esfregaços de CQI em laminotecas separadas (os positivos dos negativos), identificá-las com uma etiqueta de acordo com o tipo de controlo, data de preparação, prazo de validade (3 meses), nome do técnico que preparou e símbolo de risco biológico.

5. Conservar em lugar fresco e ao abrigo da luz.

b) Leitura, interpretação e registo dos resultados de CQI

Ler os CQI antes de iniciar a leitura das lâminas de rotina. Os resultados devem ser concordantes com os esperados, isto é, CQI+ deve ser positivo e CQI-, negativo. Caso os CQI apresentem resultados discordantes (se CQI+ for negativo, CQI- for positivo ou ambos positivos/negativos) não proceder com a leitura das lâminas de rotina. Investigar de imediato as possíveis causas de erro que possam ter ocorrido:

- Má conservação ou preparação dos reagentes
- Incumprimento do POP de coloração
- Estado de conservação, manutenção e limpeza do microscópio, entre outros.

NOTA: Anotar os resultados da leitura dos CQI no livro de registo do laboratório;

3.10.2. Controlo externo da qualidade (CQE)

Trata-se de um processo que permite que os laboratórios participantes avaliem suas capacidades pela comparação dos seus resultados aos de outros laboratórios da rede. Esse processo pode abranger os seguintes métodos:

- Teste de Proficiência executado através de exame de painéis contendo esfregaços positivos ou negativos;
- Reobservação cega das lâminas;
- Visitas de apoio técnico

3.10.3. Indicador da Qualidade

É um dado de natureza qualitativa ou quantitativa que permite avaliar o desempenho do laboratório, dos seus técnicos, ou monitora as mudanças durante um certo tempo para se definir novos objectivos ou novas formas de tomada de decisão. Para a microscopia da tuberculose os principais indicadores a serem avaliados mensalmente são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Indicadores da qualidade de baciloscopias

INDICADOR	DESCRIÇÃO	META
Número de baciloscopias feitas	Número total de lâminas processadas	Depende da meta estipulada para
Taxa de positividade para esfregaços de diagnóstico (Caso novo)	Número total de esfregaços de diagnóstico casos novos positivos/Número total de esfregaços de diagnóstico casos	Aproximadamente 10%
Taxa de positividade para esfregaços de controlo (Recaídas, falências, abandonos)	Número total de esfregaços de controlo positivos/Número total de esfregaços de controlo*100%	5-10%
Tempo de Resposta Laboratorial	Tempo desde a receção da amostra ate emissão do resultado	24-48horas
Qualidade de amostra (somente para casos novos)	Número total de amostras casos novos com aspecto de saliva/Número total de amostras casos novos recebidas*100%	<15%
Rejeição da amostra	Número de amostras rejeitadas/Total de amostras recebidas*100%	<1%
Resultados de Avaliação Externa de Qualidade (Painel de Testagem/ Reobservação Cega das lâminas)	Resultados oriundos da participação do laboratório no Painel de testagem e ou reobservação cega das lâminas	>80%

3.11. Referências

Richard Lumb Armand Van Deun Ivan Bastian Mark Fitz-Gerald, (2013). Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. Austrália.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

Keila Furtado Vieira; Edson Shusaku Shitara; Maria Elizabete Mendes; Nairo Massakazu Sumita (2011). A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. Brasil.

Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle de DST e AIDS. Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados. Tuberculose, Diagnóstico Laboratorial, Baciloscopia. Brasil. TELE-LAB.

Afrânio L. Kristski; Marcus B. Conde; Gilvan R. Muzy de Sousa (2005). Tuberculose - Do Ambulatório à Enfermaria. 3ª edição, Brasil.

Harries AD, Karnenya A, Namarika D, et al (1997). Delays in diagnosis and treatment of smear positive tuberculosis and the incidence of tuberculosis in hospital nurses in Blantyre, Malawi. Trans R Soc Trop Med Hyg.

World Health Organization (2012). Tuberculosis - Laboratory Biosafety Manual.

3.12. Anexos

ANEXO 3. Regentes de Zielh Neelsen

a) Fucsina básica - solução a 1%

- Fucsina básica5gr
- Cristais de fenol25gr
- Etanol50ml
- Água destilada.....500ml

Adicionar a fucsina num balão. Dissolver os cristais de fenol em \pm 200.0ml de água destilada. Juntar o fenol com a fucsina no balão e misturar em um agitador magnético. Adicionar a restante água e depois o álcool. Registrar no formulário de Controle de Qualidade da Fucsina Fenificada do anexo 5.

Etiquetar o frasco "1% de Fucsina básica", com data de preparação e assine com nome do Técnico preparador. A data que a garrafa é aberta primeiro deve ser escrita no rótulo. Esta solução pode ser mantida por 6 meses.

b) Solução de descoloração

- Ácido sulfúrico (concentrado).....250ml
- Água destilada.....750ml

Preparar em frascos cónicos com capacidade de 2 - 3 litros. Adicionar 750 ml de água (gelada, se possível), e depois adicionar 250 ml do ácido sulfúrico lentamente pela parede do frasco. Parar regularmente e girar lentamente o frasco para arrefecer. Se ficar muito quente, parar o processo por um período longo ou arrefece o frasco em água fresca (tomando muito cuidado para evitar que água corrente entre no frasco). Registrar no formulário Preparação de Reagentes do anexo 5.

ATENÇÃO: o ácido sulfúrico deve ser adicionado à água - NUNCA ADICIONAR ÁGUA NO ÁCIDO. Sempre use óculos de segurança/protecção e luvas, além de batas/aventais, ao manipular ácidos fortes.

Etiquetar o frasco "25% H₂SO₄", com data de preparação e assine com nome do Técnico preparador. A data que a garrafa é aberta primeiro deve ser escrita no rótulo. Esta solução pode ser mantida por 6 meses.

- Uma solução de descoloração alternativa que consiste em ácido clorídrico e álcool também é usada:
 - Etanol absoluto ou metanol 970.0ml
 - Ácido hidroclorídrico concentrado..... 30.0ml

Acrescentar sempre ácido lentamente no álcool. Usar sempre frasco de 1 litro e lentamente adicionar o ácido hidrocloreídrico no álcool.

Etiquetar o frasco "álcool-ácido 3%", com data de preparação e assine com o nome do técnico preparador. A data que do frasco que é aberto primeiro, deve ser escrita no rótulo. Esta solução pode ser mantida por 6 meses.

c) Azul-de-metileno

- Azul de metileno.....1gr
- Água destilada.....1000ml

Usar sempre frasco de 1 litro e lentamente adicionar a água destilada no balão com 1gr de azul de metileno e agitar no agitador magnético.

Etiquetar o frasco "0.1% azul-de-metileno", com a data de preparação e assine com nome do Técnico preparador. A data do frasco que é aberto primeiro, deve ser escrita no rótulo. Manter as soluções na escuridão ou em frascos escuros, e deve ser usado dentro de 12 meses.

ANEXO 3.1. Preparação de reagentes para Auramina "O"

a) Auramina fenificada

Para obter 1000ml de Auramina fenificada 0,1%, é necessário que sejam preparadas, separadamente, uma solução de Auramina (Solução A) e uma solução de fenol aquoso (solução B).

Preparação da solução A - Auramina

- Etanol (95%)100 ml
- Auramina O1g

1. Colocar a auramina O num balão de 100 ml
2. Adicionar aos poucos 70 ml do etanol no balão sobre a auramina
3. Agitar o balão suavemente até a completa dissolução
4. Completar o volume para 100 ml com etanol.

Preparação da solução B - Fenol aquoso

- Cristais de fenol30 gr
- Água destilada.....870 ml

NOTA: Se usar fenol líquido, ajustar o volume como indicado pelo fabricante.

1. Colocar o fenol num balão de 1000 ml;
2. Adicionar lentamente 870 ml de água destilada no balão sobre o fenol.

Preparação da solução Auramina fenificada 0,1%

1. Misturar todo o volume da solução A na solução B
2. Colocar esta solução num frasco âmbar bem vedado, já rotulado, com a informação:
 - a. Nome do corante e concentração (0,1%)
 - b. Data de preparação
 - c. Validade
 - d. Nome do técnico preparador
3. Manter em armazenamento, ao abrigo da luz, e à temperatura ambiente, até 3 meses.
4. Registrar no formulário Controle de Qualidade da Solução de Auramina Fenificada, no anexo 5.

ATENÇÃO: O fenol é um químico altamente corrosivo, tóxico e higroscópico. Manipular com muito cuidado para evitar com que espalhe-se e cause corrosão na balança, remover o copo cada vez que adicionar ou substituir o produto.

b) Solução de descoloração: álcool-ácido

- Ácido clorídrico concentrado 10 ml
- Etanol a 95%..... 2000 ml

Deitar lentamente 10 ml de ácido clorídrico em 2000 ml de etanol, misturar e deixar repousar por 24h.

Rotular o frasco com "0.5% descolorante álcool-ácido", com a data de preparação e com o nome do Técnico preparador. A data que o frasco é aberto primeiro, deve ser escrita no rótulo. Manter as

soluções protegidos da luz solar ou em garrafas de ambar, e deve ser usado por 6 meses.

c) Contraste: permanganato de potássio - 0.5%

- Permanganato de potássio.....5g
- Água destilada.....1000ml

Dissolver 5gr do permanganato de potássio em 1000ml de água destilada e agitar. Conservar em ambientes escuros à temperatura ambiente. Estável por 3 meses.

a) Produção de Fucsina básica

Produção de Fucsina básica a 0.1%			
Reagente	Nº de lote do fabricante	Validade	Pesagem/Volume (gr/ml)
Fucsina básica			
Fenol cristais			
Etanol 95%			
Água destilada			
Pesagem Balança - Marca:			
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Lote de Produção
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

Controlo de desempenho de Fucsina Básica a 1%	
CQI Positivo apresentou BAAR coradode amarelo com fundo preto e CQI negativo não apresentou BAAR mas sim umfundo preto como o esperado.	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado.
Lote validado	Lote invalidado
Responsável	Data de execução: ____/____/____

b) Preparação de Azul de metileno 0.1%

Produção de Azul de Metileno a 0.1%			
Reagentes	Nº de lote do Fabricante	Validade	Pesagem/Volume (gr/ml)
Azul de Metileno			
Água Destilada			
Pesagem Balança - Marca:			
Responsável		Data de execução: ___/___/___	

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Lote de Produção
Responsável		Data de execução: ___/___/___	

Controlo de desempenho de Azul de Metileno a 0.1%	
CQI Positivo apresentou BAAR corado de amarelo com fundo preto e CQI negativo não apresentou BAAR mas sim um fundo preto como o esperado.	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado.
Lote validado	Lote invalidado
Responsável	Data de execução: ___/___/___

c) Produção de Auramina fenificada

SOLUÇÃO A			
Reagentes	Nº de lote do Fabricante	Validade	Pesagem/Volume (gr/ml)
Auramina O			
Etanol 95%			
Pesagem Balança - Marca:			

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Lote de Produção
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

SOLUÇÃO B			
Reagentes	Nº de lote do Fabricante	Validade	Pesagem/Volume (gr/ml)
Cristal Fenol			
Agua destilada			
Pesagem Balança - Marca:			

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Lote de Produção
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

Controlo de desempenho da Auramina Fenicada	
CQI Positivo apresentou BAAR coradode amarelo com fundo preto e CQI negativo não apresentou BAAR mas sim umfundo preto como o esperado.	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado.
Lote validado	Lote invalidado
Responsável	Data de execução: ____/____/____

d) Preparação de Solução Descorante de Álcool-Ácido

Produção de Solução Descorante de Álcool-Ácido ____ %			
Reagentes	Nº de lote do Fabricante	Validade	Pesagem/Volume (gr/ml)
Álcool			
Ácido Clorídrico			
Pesagem Balança - Marca:			
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Lote de Produção
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

Controlo de desempenho da Álcool-Ácido	
CQI Positivo apresentou BAAR corado de amarelo com fundo preto e CQI negativo não apresentou BAAR mas sim um fundo preto como o esperado.	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado.
Lote validado	Lote invalidado
Responsável	Data de execução: ____/____/____

e) Preparação de Permanganato de Potássio

Produção de Solução Descorante de Álcool-Ácido ____ %			
Reagentes	Nº de lote do Fabricante	Validade	Pesagem/Volume (gr/ml)
Permanganato de Potássio			
Água destilada			
Pesagem Balança - Marca:			
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

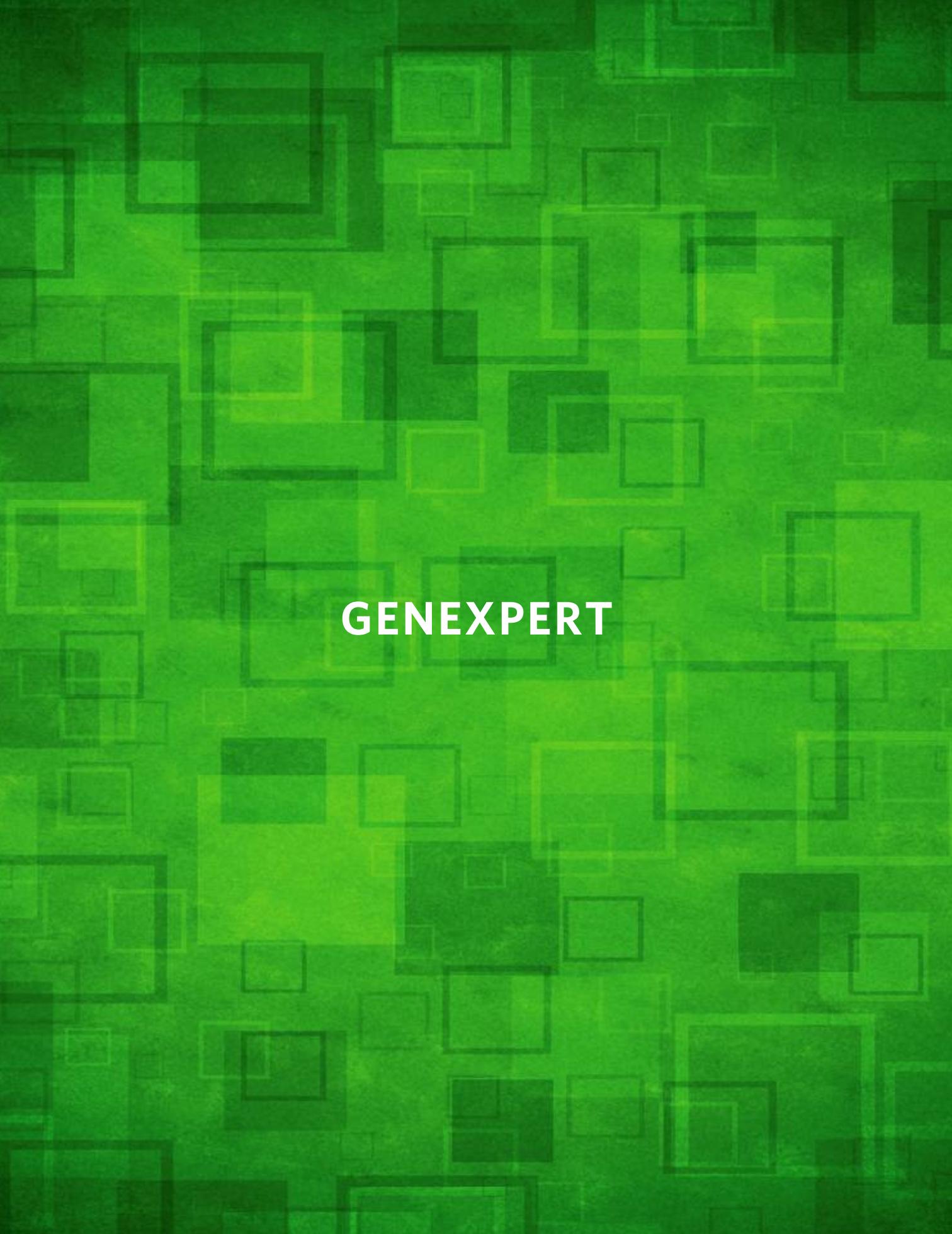
Data de Preparação	Quantidade Produzida	Validade	Lote de Produção
Responsável		Data de execução: ____/____/____	

Controlo de desempenho de Permanganato de Potássio	
CQI Positivo apresentou BAAR coradode amarelo com fundo preto e CQI negativo não apresentou BAAR mas sim umfundo preto como o esperado.	CQI positivo ou negativo apresentou resultado diferente do esperado.
Lote validado	Lote invalidado
Responsável	Data de execução: ____/____/____

ANEXO 4. Formulário do Registo de Limpeza do Microscópio

Mês: _____ Ano: _____ Código: _____ Localização: _____

DIA	ANTES DO USO					DEPOIS DO USO					Obs.	
	Horas	Limpeza		Assinatura	Horas	Horas	Limpeza		Desligou	Assinatura		
		Ocular	Objectivas				Platina	Ligou				Assinatura
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												



GENEXPERT



4. GENEXPERT

O Xpert MTB/RIF é um ensaio molecular de reacção em cadeia polimerásica (PCR) do ácido desoxirribonucleico (ADN) das bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* que permite a detecção destas e simultaneamente resistência a rifampicina. O mesmo apresenta sensibilidade acrescida quando comparada com a microscopia, no entanto, esta sensibilidade é sub-ótima, particularmente nas baciloscopias negativas, pacientes com TB/HIV e na determinação de resistência a rifampicina. O Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra) também é um ensaio molecular que foi desenvolvido como um ensaio da nova geração para superar as limitações do Xpert MTB/RIF. Ao contrário do Xpert MTB/RIF, que tem um limite de detecção de 131UFC/ml, o Ultra tem apenas 16 UFC/ml, usa dois alvos de amplificação diferentes (IS6110 e IS1081) e apresenta um compartimento maior no tubo de amplificação/ reacção (50µl comparado com 25 µl do Xpert MTB/RIF), tornando-o, por isso, mais sensível. Além disso, o Ultra usa uma análise baseada na temperatura de fusão em vez da análise do PCR em tempo real, o que permite diferenciar mutações silenciosas das mutações que conferem resistência a rifampicina. Ambos ensaios usam a mesma plataforma de GeneXpert, são simples de executar, rápidos e podem ser realizados em laboratórios de baixo risco como os de baciloscopia. No entanto, o seu funcionamento ideal exige que o instrumento esteja num ambiente com temperatura controlada (ar condicionado), com calibração em dia e ligado ao sistema de fornecimento de energia eléctrica ininterrupta (UPS) ou estabilizador de energia eléctrica.

4.1. Procedimento técnico para a realização do GeneXpert

a) Organização do trabalho

Para a realização do Xpert MTB/RIF ou Xpert MTB/RIF Ultra é necessário organizar os seguintes materiais e reagentes:

Materiais

- Cartuchos de GeneXpert;
- Tabuleiro;
- Papel absorvente/gaze
- Marcador
- Pipeta de Pasteur (incluído no kit do fabricante)

Reagentes:

- Solução de hipoclorito de sódio a 0.5%;
- Álcool a 70%;
- Reagente da amostra fornecido pela Cepheid

Procedimento de Organização:

- Antes de iniciar com o processamento da amostra assegure que o GeneXpert esteja ligado a um UPS.
- Descontaminar a bancada ou estação de trabalho com solução desinfectante;
- Dispor de tabuleiro com papel-toalha embebido em hipoclorito de sódio a 0.5%;
- Certificar-se que os escarradores contendo amostras estejam devidamente identificados;
- Dispor do reagente, cartucho e pipeta de Pasteur fornecido pela Cepheid;
- Colocar o tabuleiro com a amostra no centro da bancada ou estação de trabalho. De um lado coloque todo material limpo como reagentes, cartuchos e pipeta. Do outro lado colocar o saco de autoclave/recipiente para descarte de resíduos;
- Preparar, de cada vez, o número de amostras em função do número de módulos disponíveis (ou seja, em funcionamento);
- Iniciar a preparação das amostras dentro de 30 minutos antes de um módulo estar disponível;
- Não abrir o cartucho até a amostra estar pronta para realizar o teste;
- Utilizar o cartucho dentro de 30 minutos após abertura da tampa.

Não utilize o cartucho se:

- O prazo de validade estiver vencido;
- Estiver húmido;
- A tampa partida ou com abertura;
- Cair antes ou após a adição da amostra;
- O tubo de reacção na parte traseira parecer estar danificado;
- Já tiver sido processado: cada cartucho destina-se apenas a uma utilização e não pode ser reutilizado após ter sido digitalizado;
- A sua embalagem (bolsa de 10 ou 50 cartuchos) estiver aberta há mais de 6 semanas.

Identificação do cartucho:

- Pegue no cartucho apenas pelo lado direito e esquerdo. Não toque na tampa, no código de barras na parte da frente e nem no tubo de reacção na parte traseira;
- Rotule o cartucho com o número da amostra escrevendo no seu lado esquerdo ou direito ou afixe o rótulo de identificação do paciente;
- Não coloque o rótulo na tampa do cartucho nem obstrua o código de barras existente no cartucho.

b) Execução da técnica

Amostras de expectoração espontânea, expectoração induzida e lavado gástrico:

1. Abrir cuidadosamente a tampa do escarrador/recipiente de expectoração
2. Adicionar o reagente da amostra (SR) directamente para a amostra na proporção de 2:1, isto é, se tiver 1ml de expectoração, por exemplo, adicionar 2 ml de SR por forma a obter

isto é, se tiver 1ml de expectoração, por exemplo, adicionar 2 ml de SR por forma a obter um volume final de 3 ml no escarrador. Note que 1 ml de amostra é a quantidade mínima para o processamento no GeneXpert, enquanto que 3-4 ml de amostra se a quantidade ideal necessária.

3. No caso de amostras com um volume maior (mais de 4 ml), será necessária uma porção de reagente de amostra (SR) de um segundo frasco, visto que cada frasco contém 8 ml de SR. No entanto, recomenda-se o uso de um frasco de reagente para cada amostra.
4. Fechar novamente o escarrador/recipiente e agitar energeticamente 10-20 vezes (um movimento para a frente e para trás é considerado uma agitação única) ou agitar no vórtex por 20 segundos;
5. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos
6. Após os 10 minutos de incubação, agitar a amostra novamente 10-20 vezes ou agitar no vórtex;
7. Após 5 minutos de incubação adicionais, a amostra deverá estar perfeitamente líquida antes de ser testada, isto é, deve estar sem grumos de expectoração visíveis. Se ainda estiver viscosa, espere 5-10 minutos adicionais antes de a inocular no cartucho (2-4 ml da solução final)

Amostra concentradas (Aplicável apenas aos Laboratórios de Referência da TB):

1. Adicionar 1,5 ml de reagente de amostra à 0,5 ml de sedimento suspenso de uma amostra de expectoração descontaminada e concentrada (Nota: o rácio de reagente para amostra é de 3:1)
2. Fechar a tampa do recipiente contendo a mistura de reagente e amostra e agitar energeticamente 10-20 vezes ou agite num vortex por 20 segundos;
3. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos;
4. Após 10 minutos de incubação, agitar vigorosamente a amostra novamente 10-20 vezes ou agite no vortex;
5. Após 5 minutos de incubação adicionais, a amostra deverá estar perfeitamente líquida antes de ser testada, sem grumos de expectoração visíveis.

Amostras extrapulmonares:

A OMS recomenda o uso das seguintes amostras extrapulmonares para testagem pelo Xpert MTB/RIF:

Líquido céfalo raquidiano (LCR)

- As amostras de LCR são, normalmente, paucibacilares e podem ser processadas de forma similar a expectoração. Contudo, a concentração da amostra através da centrifugação (sedimentação) pode fornecer melhores resultados ao teste. Para tal, deve-se assegurar que a centrifugação seja feita num tubo hermeticamente fechado.

NOTA: Amostras de LCR contendo sangue podem interferir negativamente no resultados do teste Xpert.

Amostras de LCR com volume maior ou igual a 5 ml:

1. Transferir para um tubo cônico e centrifugar a 3000 g por 15 minutos
2. Decantar o sobrenadante em um recipiente com solução desinfetante
3. Ressuspender o sedimento com tampão fosfato até um volume de 2 ml usando o Reagente da Amostra do Xpert MTB/RIF
4. Inocular o cartucho com a amostra processada e realizar o teste Xpert no equipamento

Amostra de LCR com volume entre 1-5 ml:

1. Adicione igual volume de Reagente à amostra e agitar vigorosamente 10 a 20 vezes.
2. Adicione 2 ml no cartucho e realize o teste no equipamento.

Amostra de LCR com volume entre 0,1-1 ml

1. Adicione 2 ml de Reagente à amostra
2. Adicione 2 ml no cartucho e realize o teste Xpert no equipamento

Amostra de LCR com menos de 0,1 ml:

A amostra é considerada insuficiente para Xpert MTB/RIF /RIF ou Xpert MTB/RIF Ultra

Aspirados de linfonodos, linfonódos e outros tecidos:

Devem ser processadas em Cabines de Segurança Biológica. Aspirados de linfonodos devem ser processados como expectorações concentradas (através da homogeneização e concentração numa centrífuga).

Para os linfonodos e outros tecidos, proceder da seguinte forma:

1. Cortar a amostra de tecido usando tesoura e pinças estéreis;
2. Colocar num homogeneizador ou num almofariz estéril;
3. Adicionar 2 ml de solução de tampão fosfato estéril (PBS);
4. Triturar até obter uma suspensão homogênea;
5. Deixar em repouso para que as partículas maiores se assentem no fundo (5-10 minutos);
6. Colocar 0,7 ml do sobrenadante em um tubo cônico com tampa de rosca (certificar-se que nenhum grumo de tecido seja transferido);
7. Adicionar 1,4 ml do Reagente aos 0,7 ml de amostra usando uma pipeta esterilizada e agitar vigorosamente 10 a 20 vezes.
8. Inocular no cartucho com 2 ou + ml e realizar o teste.

Amostras líquidas que chegam ao laboratório em seringas devem ser processadas dentro das CSB, pois a extracção do conteúdo da seringa em um tubo cônico de 50 ml pode também produzir aerossóis com bacilos. Medidas de biossegurança devem ser adoptadas para trabalhar com material perfuro-cortantes.

NOTA: amostras concentradas e extrapulmonares devem ser processadas apenas nos laboratórios de referência da tuberculose por envolver o procedimento de centrifugação, que gera aerossóis e exigem requisitos de biossegurança de laboratórios de alto nível de contenção de risco.

Armazenamento de amostras:

Expectoração concentrada ou não concentrada: refrigerar a 2-8 °C durante 10 dias no máximo. Se necessário, armazene a temperatura ambiente (máximo até 35 °C) por até 3 dias e, de seguida, refrigere a 2-8 °C por uma duração máxima de 7 dias.

Armazenamento da amostra na presença de um reagente de amostra:

Expectoração concentrada ou não concentrada: conserve de 2-8 °C e processe no prazo de 12 horas. Caso a refrigeração não seja possível, processe dentro de 5 horas.

Armazenamento de um cartucho inoculado (por vários motivos, como por exemplo, em caso de falha de energia)

Realize o teste dentro de 4 horas após a adição da amostra. Caso tenha passado mais de 4 horas, inócupe um novo cartucho.

c) Preparação do cartucho

Inoculação:

1. Abrir o cartucho e pipete 2 ml de amostra preparada utilizando a pipeta plástica de Pasteur.
2. Pipetar a amostra cuidadosamente para evitar a produção de aerossóis e bolhas;
3. Introduzir o volume pipetado no cartucho;
3. Fechar firmemente a tampa do cartucho e Iniciar o teste no equipamento.

d) Realização do teste

1. Ligar o instrumento GeneXpert (irá aparecer uma pequena luz azul no painel frontal);
2. Ligar o computador;
3. Iniciar a sessão no Windows como utilizador Cepheid:

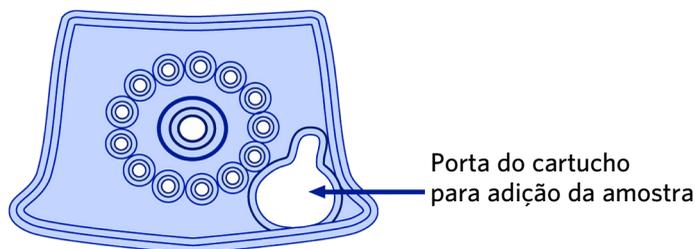


Figura 14. Cartucho Xpert MTB/RIF (vista superior) ou Xpert MTB/RIF Ultra (vista superior)

d) Realização do teste

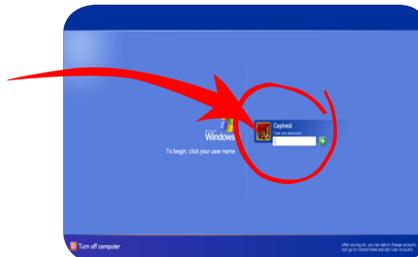
1 Ligar o instrumento GeneXpert
(irá aparecer uma pequena luz azul no painel frontal);

2 Ligar o computador;

3 Iniciar a sessão no Windows
como utilizador **Cepheid**



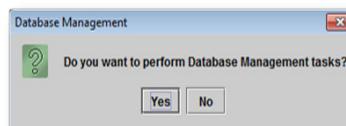
4 Introduzir a palavra passe: **cpnd**



5 Clicar duas vezes no ícone
«GeneXpertDx» no ambiente de
trabalho do computador;

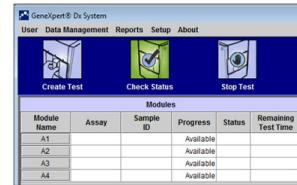


6 Iniciar sessão com a conta de
utilizador;
Clicar em "Não (No)" na caixa de
diálogo "Gestão da base de dados
(database management)" para iniciar a
sua sessão de trabalho;



7

Clicar em “Verificar estado (check status)” para confirmar se todos os módulos estão disponíveis;



8

Clicar em “criar teste” (create test)



9

Escolher o registo manual ou efectuar automaticamente a leitura do código de barra directamente do cartucho.



10

Utilizar o leitor de códigos de barras para digitalizar o código de barras do cartucho deixando o botão amarelo pressionado. Após o aviso sonoro, afaste o leitor do cartucho para evitar digitalizar o código de barras duas vezes.



11

Após ter digitalizado o código de barras, irá surgir a janela “criar teste (createtest)”.
Introduzir “Identificação do doente (Patient ID)” = Nome e idade (ver com o pessoal do GX Alert).
Introduzir “Identificação da amostra (ID Sample)” = Número do laboratório e proveniência (ver com o pessoal do GX Alert).



12

O software atribuiu um módulo a ser utilizado automaticamente. (Nota: é seleccionado o módulo menos utilizado, mas pode se seleccionado um módulo diferente manualmente).

Clicar em "Iniciar teste (start test)".



Colocação do cartucho

1

Abrir completamente a porta do compartimento para cartuchos do módulo atribuído indicado pela luz verde intermitente acima do módulo seleccionado;

2

Colocar o cartucho cuidadosamente com o código de barras virado para a frente;

3

Manter o cartucho na vertical; evitar agitar, inclinar ou deixar cair;

4

Ao fechar a porta do compartimento para cartuchos, o teste é iniciado automaticamente;



Introdução manual do código de barras do cartucho

Se o leitor de códigos de barras não estiver a funcionar, pode introduzir o código de barras do cartucho manualmente:

1

Clicar em «Criar teste (create test) »



2

Digitalizar o código de barras do cartucho e clique em «Introdução manual (manual entry)»



3

Digitalizar os números de 2 linhas dos cartuchos manualmente



Monitorar o estado do teste

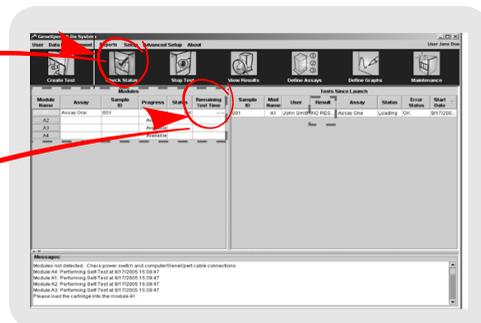
Se pretender observar o progresso da execução do teste, pode verificar:

- Progresso do teste (por exemplo, 3/45 significa que o teste está no terceiro de 45 ciclos de PCR);
- Tempo restante até ao final do teste;
- Estado do teste (por exemplo: "OK");
- Se o estado exibir erro ou aviso, veja as Mensagens para obter uma descrição do problema;

Clicar em "verificar estado (check status)»

É indicado o progresso, o estado e o tempo restante

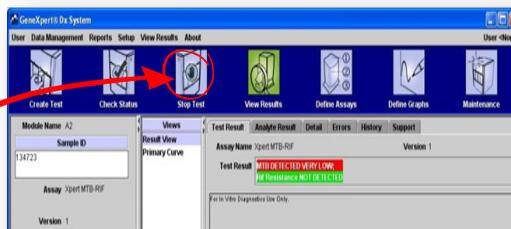
Mensagens com mais detalhes



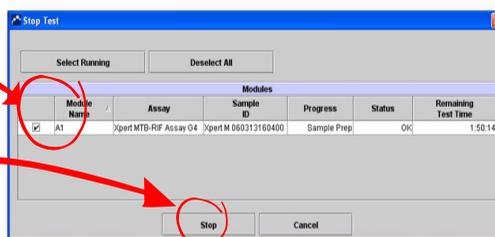
Interrupção de um testes

Caso queira interromper um teste, por exemplo, se o cartucho não foi devidamente preparado, pode-se interromper o teste da seguinte forma:

1 Clicar em "parar teste (stop test)"

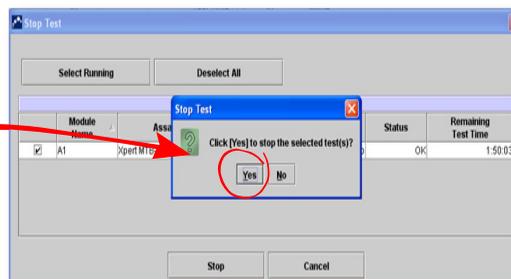


2 Seleccionar o(s) módulo(s) que deve(m) ser interrompido(s) marcando a caixa de verificação

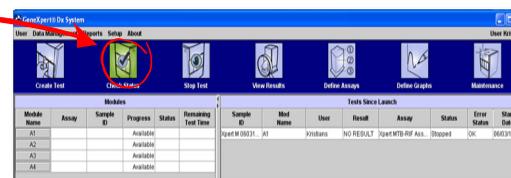


Após seleccionar, clique em "Parar"

3 Confirmar a sua escolha clicando em "Sim (yes)"



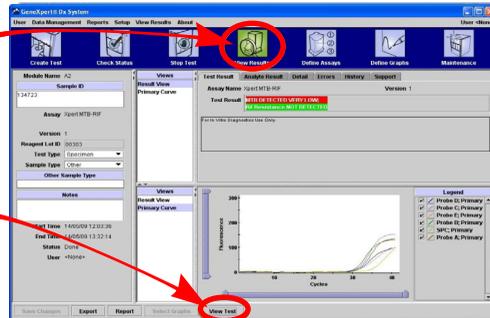
4 Poderá observar os detalhes da paragem do teste na secção "Verificar estado (check status)"



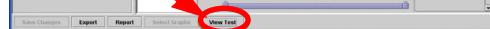
e) Leitura e interpretação dos resultados

Os resultados são interpretados pelo software do GeneXpert e serão visualizados na janela "Ver Resultados (view results)":

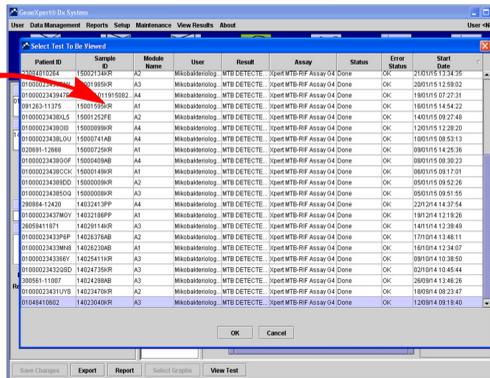
1 Clicar em "ver resultados (view results)"



2 Para visualizar um resultado em particular, clicar em "ver teste (view test)"



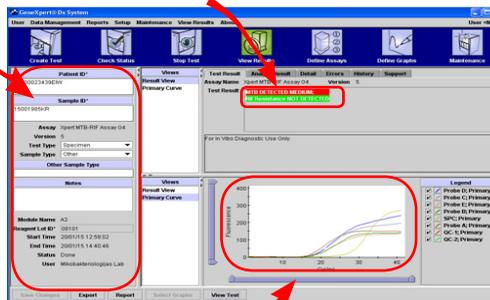
3 "ver teste": clicar duas vezes no teste que pretende visualizar



Informações sobre o teste

Interpretação dos resultados

4



Curvas de PCR em tempo real

MTB detectado

Resultado positivo se o ADN da micobactéria for detectado, os resultados serão visualizados como Alto, Médio, Baixo e Muito baixo. Os valores de limite de ciclo (Ct) mais baixos representam uma concentração inicial de ADN mais elevada; valores de Ct mais altos representam uma concentração inicial de ADN mais baixa (tabela 4).

Tabela 4. Interpretação dos resultados positivos em função do limite do ciclo

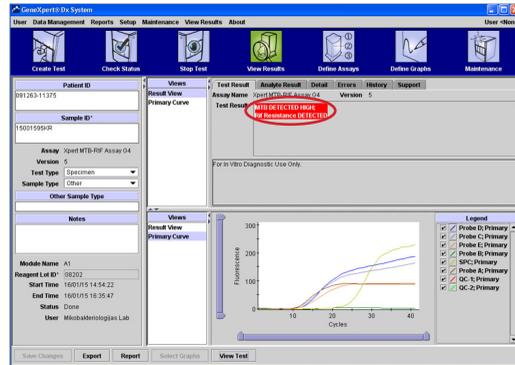
Resultado de MTB	Valores de Ct
Alto (high)	<16
Médio (medium)	16-22
Baixo (low)	22-28
Muitobaixo (very low)	>28

Nota: A interpretação dos resultados do Ultra para detecção de MTB é a mesma que a do Xpert MTB/RIF, com exceção dos resultados “Traços de MTB detectado (MTB detected trace)”. Os resultados “Traços de MTB detectado” não fornecem informação sobre resistência a rifampicina, por isso, nestes casos recomenda-se à testagem por testes de sensibilidade fenotípico ou genotípico para confirmar ou excluir a resistência a rifampicina.

Associado ao resultado positivo na detecção da micobactéria, aparecerá de igual modo o resultado da rifampicina:

Resistência arifampicina detectada (detected)

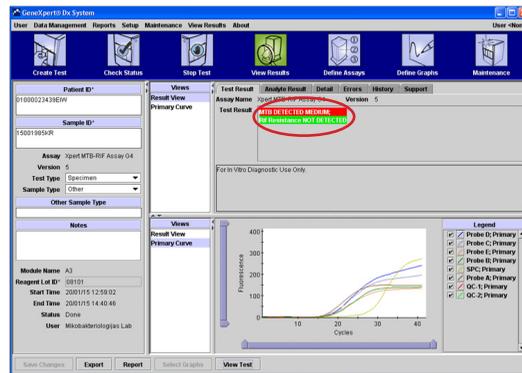
A mutação no gene rpoB foi detectada.



Resistência a rifampicina não detectada (not detected)

Não houve detecção da mutação no gene rpoB.

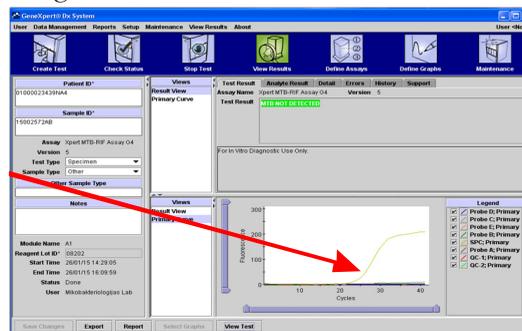
Resistência a rifampicina indeterminada (indeterminate): A concentração de Mycobacterium tuberculosis era muito baixa e não foi possível determinar a resistência devido a insuficiência de dados para interpretar os sinais associados à resistência, sendo necessária uma nova amostra.



MTB não detectado

Resultado negativo: o ADN alvo não é detectado, no entanto, o controle de processamento da amostra (SPC) deve ser positivo em amostras negativas.

Controle de processamento de amostras (SPC)

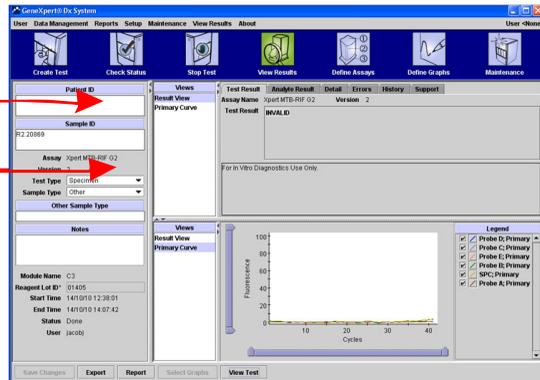


Resultado inválido

Não foi possível determinar a presença ou a ausência de MTB

Resultado inválido

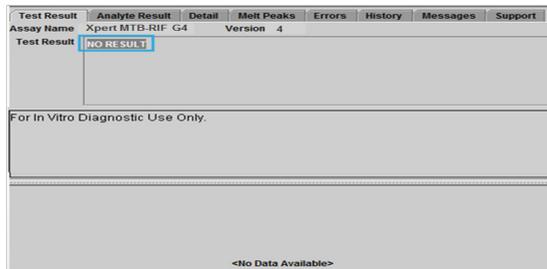
SPC negativo

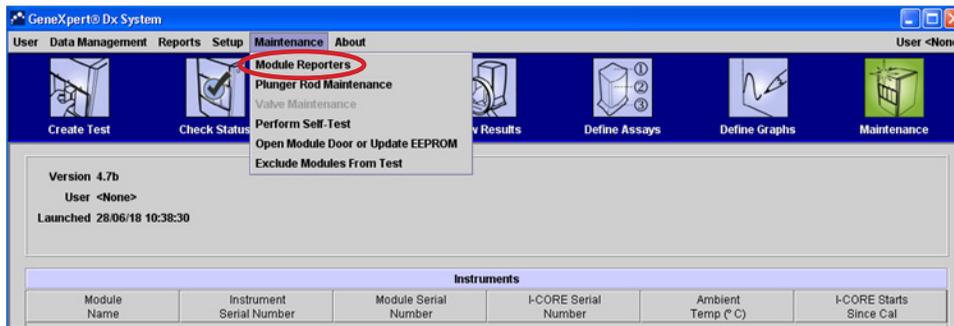


Origem	Consequência	Solução
PCR foi inibido devido interferência de substâncias	Falha no controlo interno	Use a amostra correcta
Foi usada amostra inadequada		Evite a presença de substâncias inibidoras na amostra (ex: pús, citrato, bilirrubina, etc)
Amostra má colhida/ conservada/preparada		Verifique a qualidade da amostra (densidade, viscosidade)
Condições inadequadas de conservação dos cartuchos		Siga recomendações para a colheita, conservação e preparação da amostra
		Verifique as condições de armazenamento dos kits e prazos de validade

Sem resultado

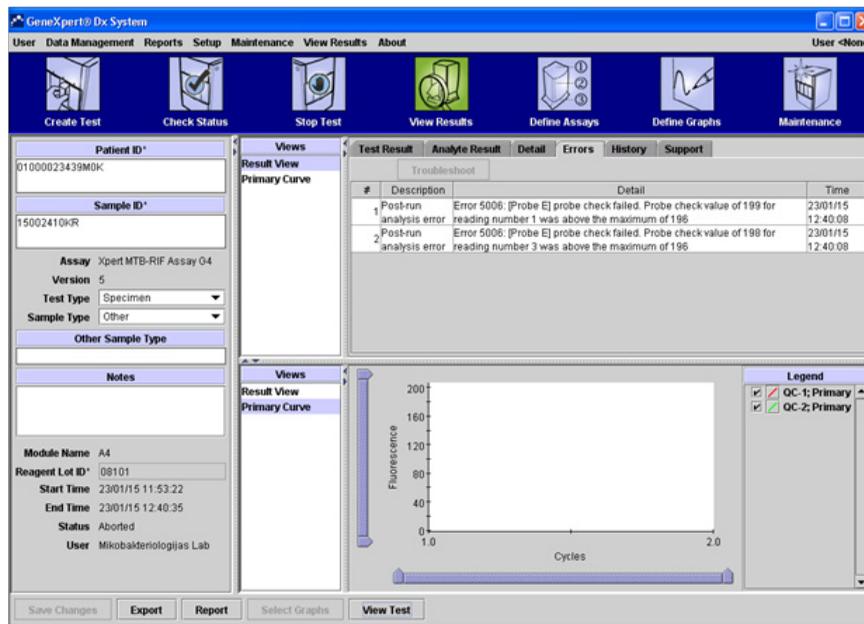
Recolha de dados insuficientes





ERROS

Durante o processamento de amostras no GeneXpert podem ocorrer diversos erros (5006/5007/5008/5011/2008/2127/2037/2014/3074/3075/1011). O tipo de erro e respectivas causas podem ser visualizadas como ilustra o painel abaixo.



ERRO 5007/5006

- O controlo de verificação da sonda falhou e o teste foi interrompido antes da amplificação.

Origem	Consequência	Solução
Amostra densa ou muito viscosa	Filtro do cartucho parcialmente obstruído	Após 15 minutos de descontaminação, se a amostra continuar viscosa não a coloque no cartucho. Aguarde por 10 minutos adicionais até a amostra ficar completamente liquefeita e, em seguida, transfira-a para o cartucho utilizando uma pipeta
Volume Inadequado da amostra	Rehidratação inadequada das esferas PCR não pode ocorrer	Adicione sempre volume adequado da amostra (O volume transferido para o cartucho deve estar entre os 2 e 4 ml no máximo). Evite a formação de bolhas ao
Problemas na integridade da sonda	Sondas danificadas	Armazenar os cartuchos de acordo com as instruções (temperatura e Humidade)
Manutenção insuficiente	Poeira acumulada no interior do instrumento	Realize a manutenção regular segundo recomendações do fabricante

ERRO 2008

- A pressão excedeu o nível máximo aceitável.

Origem	Consequência	Solução
Amostra muito viscosa ou densa	Filtro do cartucho obstruído	Assegure que as amostras não tenham partículas sólidas
Amostras contendo partículas alimentares, detritos		Assegure que a amostra esteja líquida antes de transferir para o cartucho
Mau funcionamento do Módulo	Erro 2008 ocorre regularmente no mesmo módulo	Contacte o ponto focal para assistência/representante da

ERRO 212 (X)

- Perda de comunicação entre o (s) módulo (s) e o software enquanto o teste está a decorrer. Possíveis errors: 2120; 2121; 2122; 2123; 2124; 2126; 2127

Origem	Consequência	Solução
Fornecimento de corrente eléctrica (fonte ou UPS)	Perda de comunicação em todos os módulos	Certifique se o fornecimento de energia é estável (UPS com estabilizador de energia, gerador)
Problemas na conexão entre PC-GX		Desligue e volte a ligar o cabo de Ethernet entre o computador e o instrumento.
Temperatura da sala		Assegure que a temperatura da sala esteja entre 15°-30°C
Vírus no computador		Faça "scan" no computador do Gxpert
Actualização automática do anti-virus		Proceda com actualização manual do anti-virus sem que nenhum teste esteja a decorrer
Adaptador do laptop		Verifique se o adaptador não está solto
Placa de gateway e/ou falha no fornecimento de energia		Desligue e volte a ligar o cabo de comunicação entre a placa de gateway e o GeneXpert
Temperatura interna do módulo	Perda de comunicação em todos os módulos	Na secção de manutenção verifique se a temperatura interna do módulo é <39°C
Problemas de conexão dentro do GeneXpert		Contacte o ponto focal para assistência/representante da

ERRO 5011

- Detectado perda de sinal na curva de amplificação;

Origem	Consequência	Solução
Tampa do cartucho permite que o ar escape	Perda de pressão no cartucho	Use um novo cartucho
Mau funcionamento da válvula do cartucho		Contacte o ponto focal para assistência/representante da

- Problemas relacionados com a Temperatura

Origem	Consequência	Solução
Temperatura ambiente não se encontra dentro do recomendado	ERROS 1001 1002 2014 4009 4010 4017	Assegure que a temperatura esteja entre 15°-30°C
		Verifique o espaço a volta do sistema (deve existir um espaço livre de 10-15 cm)
		Verifique a temperatura interna dos módulos
		Verifique se os filtros estão limpos
Avaria da ventoinha do GeneXpert		Verifique a funcionalidade da ventoinha (painel traseiro no sistema)
Mau funcionamento do aquecedor do módulo		Contacte o ponto focal para assistência/representante da Cepheid

Na janela do sistema GeneXpertDx, clique em "Manutenção (maintenance)" na barra de menus e seleccione "Relatórios de módulo (module reporters)" para verificar as temperaturas do módulo.



f) Registo dos resultados

Os resultados do GeneXpert devem ser lançados no livro de registo e Requisição laboratorial. Todos os registos laboratoriais devem ser guardados segundo a política nacional. De modo semelhante a microscopia, utilize uma caneta vermelha para os resultados positivos e resistentes e, coloque o nome e assinatura do técnico que realiza o teste.

O registo e emissão de resultados correctamente é imperioso para evitar resultados imprecisos ou falsos:

Falsos-negativos significa que os resultados reportados como negativos eram na verdade positivos. Implicação: Os pacientes com TB podem não ser tratados, resultando em doença prolongada, transmissão da doença ou morte.

Falsos-positivos significa que os resultados reportados como positivos eram na verdade negativos. Implicação: Os pacientes são tratados desnecessariamente ou o tratamento pode continuar além do necessário. Neste caso, serão desperdiçados medicamentos e o paciente tem uma condição subjacente diferente que exige tratamento.

4.2. Controlo e indicadores da qualidade

4.2.1. Controlo interno da qualidade

Cada cartucho XpertMTB/RIF inclui controlos internos, não sendo necessário controlos adicionais:

Controlo de processamento da amostra (SPC) que contém esporos não infecciosos, inclusos em cada cartucho para verificar o processamento adequado de MTB (verifica que ocorreu lise do MTB, verifica se o processamento da amostra foi adequado, detecta inibidores, associados à amostra, do teste de PCR em tempo real). O SPC deve ser positivo em uma amostra em que o resultado é MTB Não detectado, e pode ser negativo ou positivo em uma amostra para a qual o resultado é MTB detectado. Se o SPC for negativo em uma amostra "negativa", o resultado do teste será Inválido.

Controlo de verificação da sonda (PCC) que mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorar a rehidratação das esferas de reagentes, preenchimento do tubo de reacção, integridade da sonda e estabilidade do corante de fluorescência. Os resultados são automaticamente comparados a configurações de fábrica pré-estabelecidos no software. Se a Verificação de Sonda não passar, então o teste é interrompido e obtém-se um resultado de Erro.

4.2.2. Controlo externo da qualidade

O controlo externo de qualidade serve para melhorar o desempenho da rede laboratorial, identificar e resolver problemas. Cada módulo do instrumento GeneXpert deve ser avaliado como sendo "apto para a finalidade" através da verificação com material conhecido positivo e/ou negativo antes de começar os testes das amostras clínicas.

Um teste de verificação deve ser realizado por módulo, após:

- A instalação do instrumento
- Após calibração ou troca de módulos do instrumento.

Painéis de verificação são agora rotineiramente distribuídos pela empresa Cepheid com cada novo instrumento e com módulos recalibrados.

- Esses painéis de verificação consistem de um cartão contendo 5 botões de cultura seca (BCS) de uma concentração conhecida de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis à rifampicina cultivados.
- As amostras BCS devem ser processadas de acordo com as instruções e uma amostra deve ser testada por módulo. Os resultados esperados é que sejam todos MTB Detectado, resistência à RIF não detectado

NOTA: Se um resultado inválido, erro ou inexistente for obtido em qualquer módulo, repita o teste naquele módulo usando a amostra BCS extra fornecida. Caso não obtenha o resultado esperado em qualquer módulo, consulte o capítulo de Solução de Problemas. Os resultados da verificação de instrumento devem ser enviados para o supervisor designado do GeneXpert. A Cepheid ou seu representante deve ser contactada imediatamente para auxiliar com quaisquer questões encontradas durante o processo de verificação.

O Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade (PNAEQ) envia painéis elaborados pelo Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose (LNRT) com isolados bacterianos aos laboratórios participantes. Após o processamento de isolados cada laboratório deverá enviar os resultados dentro de 1 mês ao PNAEQ. Este painel servirá para avaliar os principais processos pré-analíticos, analíticos e pós analíticos que ocorram no local do teste. Os resultados são comparados aos resultados esperados e com outros laboratórios. Os resultados são monitorados para traçar tendências com o passar do tempo. O painel de proficiência não mede o desempenho rotineiro do laboratório mas pode identificar deficiências graves

a) Monitoria de Indicadores de Qualidade

A monitoria rotineira de indicadores de qualidade é um elemento decisivo para a garantia de qualidade para qualquer teste diagnóstico. A tabela 5 lista os indicadores recomendados a serem analisados mensalmente e devem estar interligadas com ações correctivas se forem observados resultados ou tendências inesperados. Qualquer mudança nos indicadores de qualidade (tais

como aumento das taxas de erro, mudança na taxa de positividade de MTB ou na taxa de resistência à RIF ou mudança significativa no volume de testes realizados) deve ser documentada e investigada. A informação deve ser recolhida de forma desagregada de acordo com o grupo de população testada (Pacientes HIV presumptivos de TB, presumptivos de TBMR, TB

Tabela 5. Indicadores de qualidade do GeneXpert MTB/RIF.

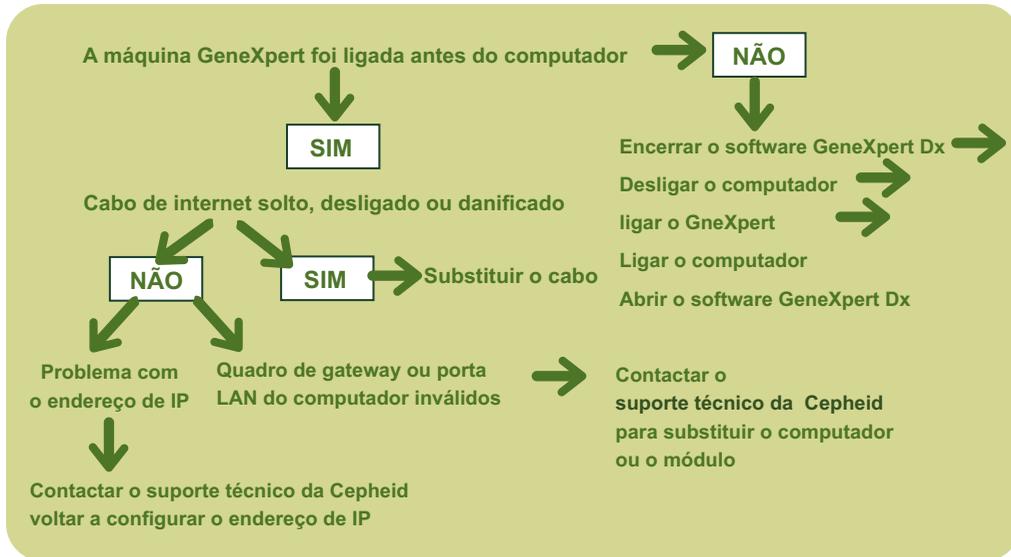
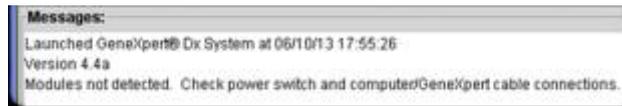
Indicador	Descrição	
Número e proporção de MTB detectado, Resistência a Rifampicina não detectada	Número de MTB detectado, Resistência a Rifampicina não detectada /Número total de testados	
Número e proporção de MTB detectado, Resistência a Rifampicinadetectada	Número de MTB detectado, Resistência a Rifampicinadetectada /Número	
Número e proporção de MTB detectado, Resistência a Rifampicina indeterminada	Número de MTB detectado, Resistência a Rifampicina indeterminada / Número total de testados	
Número e proporção de MTB não detectado	Número de MTB não detectado / Número total de testados	
Número e proporção de erros	Número de erros / Número total de testados	<3%
Número e proporção de resultados inválidos	Número de resultados inválidos / Número total de testados	<1%
Número e proporção de sem resultados	Número de sem resultados / Número total de testados	<1%
Tempo de resposta laboratorial	Tempo desde a recepção da amostra e emissão do resultado	2-24 h

4.3. Resolução de problemas

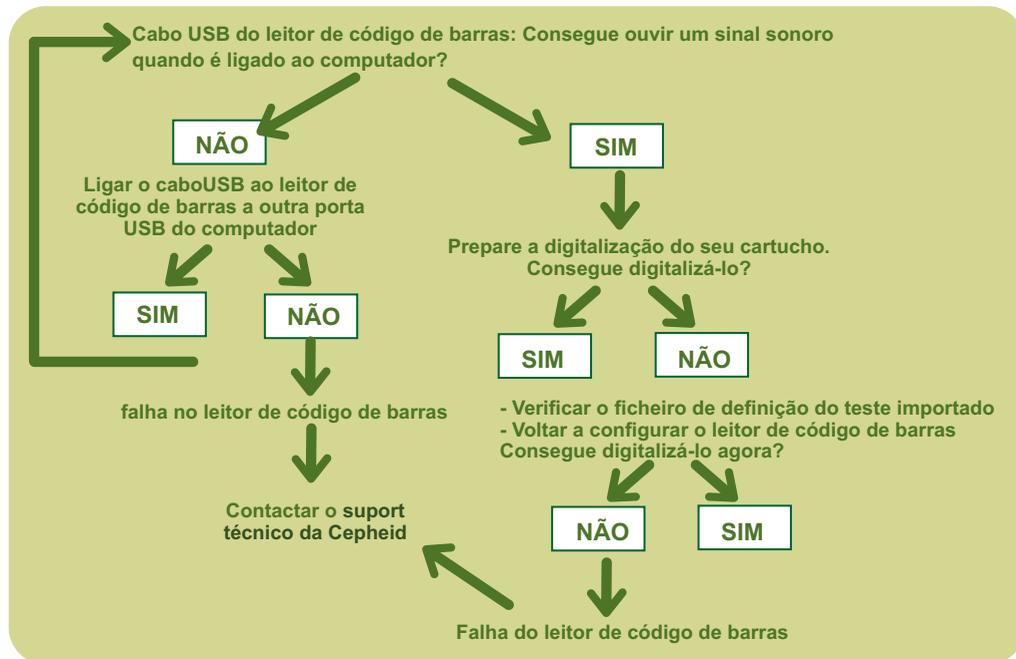
Aquando da utilização do GeneXpert podem ocorrer alguns problemas tais como:

- Os módulos GeneXpert não são detectados;
- O leitor de código de barras não está a funcionar;
- A luz vermelha no módulo está a piscar;
- O cartucho está preso no GeneXpert.

4.3.1. Os módulos GeneXpert não são detectados.

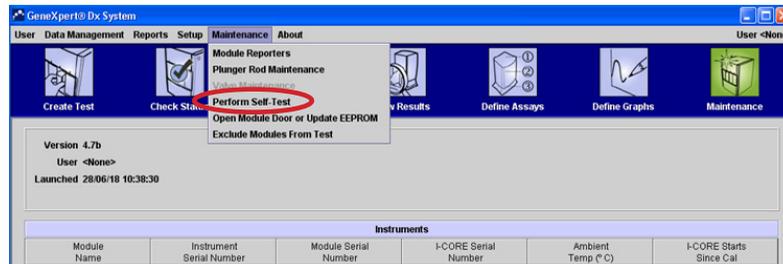


4.3.2. Erro no leitor de código de barras



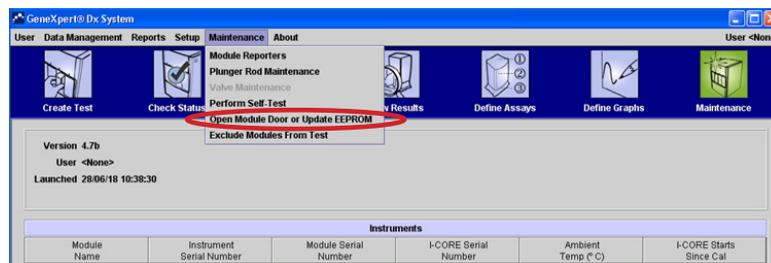
4.3.3. Luz vermelha no módulo está a piscar

A luz vermelha a piscar pode significar que o módulo possa estar a falhar. Na janela do sistema GeneXpertDx, clicar em "Manutenção (maintenance)" na barra de ferramentas e seleccionar "Executar autoteste". Se o problema persistir, contactar o suporte técnico da Cepheid



4.3.4. Cartucho preso no GeneXpert

Inicialmente verificar se a porta do módulo está fechada. Tente abrir lentamente a porta do módulo. Caso não ultrapasse este problema, clicar em "Manutenção (maintenance)" na janela do sistema GeneXpertDx na barra de ferramentas e seleccionar "Abrir porta do módulo ou actualizar EEPROM (open module door or update EEPROM)"



Encerrar o software e volta a reiniciá-lo. Quando o software for reiniciado, o módulo irá iniciar-se colocando a válvula e o êmbolo na posição correcta. Isto pode ajudar a abrir a porta; ou desligar o sistema, reiniciar o instrumento GeneXpert e o software, na janela do sistema GeneXpertDx, clicar em "Manutenção" na barra de ferramentas e seleccionar "Executar autoteste (perform self-test)".

Se nenhuma das soluções anteriores funcionar, remover manualmente o cartucho.

NOTA: A remoção manual do módulo deve ser executado pelo supervisor do laboratório ou por outro técnico qualificado.

4.4. Como proceder se

4.4.1. Iniciar o teste e aperceber-se de que não introduziu o ID da amostra (por exemplo, código do laboratório)

- a) Aceder a "Ver resultados (view results)" para este módulo, no final da execução do teste.
- b) Remover o cartucho do módulo.
- c) Certificar-se de que copia o número do ID do cartucho no campo do ID de amostra (no software) no lado esquerdo. Gravar as alterações.

4.4.2. Aperceber-se de que a amostra de um paciente não contém volume suficiente (é necessário >1ml)

- a) Geralmente, o volume deve ser assegurado pelo técnico de saúde que recebe a amostra.
- b) É importante verificar o volume durante a receção da amostra no laboratório.
- c) Processe se tiver, pelo menos, 1 ml e informe o técnico de saúde de forma apropriada para garantir que mais de 1ml seja obtido no futuro.
- d) Se houver menos de 1 ml, solicitar uma nova amostra.

4.4.3. O GeneXpert for transportado com um cartucho no interior

Risco elevado de danificar o módulo. Recomenda-se o seguinte:

1. Notificar a Cepheid (contacte o suporte técnico da Cepheid)
2. Antes de transportar o sistema, desbloquear o módulo preso e execute um procedimento de limpeza completo.
3. Se o sistema for transportado com um cartucho no interior, assim que recolocar o sistema, remova o cartucho, limpe o módulo (procedimento de limpeza normal) e verificar se o sistema funciona correctamente
4. Monitorar o módulo.

A melhor forma de prevenir: se um sistema for transportado/recolocado, verificar se existe algum cartucho no módulo antes de mover o sistema.

4.4.4. O teste é interrompido pelo GeneXpert

1. Documentar no formulário de resultados Xpert.
2. Repetir o teste se restar, pelo menos, 2 ml de SR/mistura de expectoração.
3. Se restar um volume insuficiente, solicitar uma nova amostra.

4.4.5. O Reagente da amostra derramar nas mãos, face e olhos

- Olhos: Provoca lesões graves nos olhos. Lavar cuidadosamente com água durante alguns minutos. Se utilizar lentes de contacto remova-as. Continue a lavar. Consulte um médico.
- Pele: Provoca irritação na pele. Lavar abundantemente com sabão e água. Consulte um médico.
- Ingestão: Pode ser perigoso se ingerido. Lavar a boca com água. Consulte um médico.
- Inalação: Pode provocar sonolência ou tonturas. Se tiver dificuldades em respirar, vá para um local fresco e consulte um médico.

4.4.6. Deixar cair o cartucho inoculado ao transportá-lo para o GeneXpert

- a) Não coloque o cartucho no instrumento.
- b) Siga os procedimentos de derrames nas orientações relativas à biossegurança.

Para evitar deixar cair os cartuchos, utilize luvas secas e um carrinho para transportar. Caso aconteça um derrame: consulte o capítulo de Biossegurança.

4.4.7. Outros problemas com hardware, software ou reagentes: como proceder?

- Procure o número do erro no manual do utilizador GeneXpert e execute as medidas correctivas recomendadas.
- Contacte o seu fornecedor local ou o suporte técnico da Cepheid.

Se possível, continue a realizar testes em outros módulos enquanto resolve qualquer problema do módulo específico.

4.4.8. Quando é necessário substituir o módulo?

- Se um problema com o hardware provocar a falha do módulo;
- Se o software indicar que o módulo não está disponível;
- Se o software indicar outro problema com o módulo;
- Possivelmente se a taxa de erro estiver a aumentar (isto pode indicar um problema com o hardware).

Contacte o ponto focal para assistência/representante da equipa da Cepheid para o suporte técnico.

4.5. Referências

WHO (2014), Xpert MTB/Rif implementation manual technical and operational “How-to” practical considerations, Geneva 27, Switzerland

Global Laboratory Initiative (GLI),

http://www.stoptb.org/wg/gli/TrainingPackage_Xpert_MTB_RIF.asp

Cepheid (2016), GeneXpert® & Xpert® Assays: Quick Start Guides, D19277, Rev. B.1, France

Global Laboratory Initiative. Planning for country transition to Xpert MTB/RIF Ultra cartridge. 2017. Geneva. disponível em www.stoptb.org

Taiza Maschio de Lima, N.C.U.B., Susilene Maria Tonelli Nardi, Heloisa da Silveira Paro Pedro, GeneXpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis. Rev Pan-Amaz Saude, 2017. 8 (2): p. 67-78.

Theron G, P.J., van Zyl-Smit R, et al., Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting. Am J Respir Crit Care Med, 2011. 184: p. 132-140.

Rachow A, Z.A., Heinrich N, et al., Rapid and accurate detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay—a clinical validation study. PLoS One, 2011. 6: p. e20458.

The background is a solid green color with a pattern of overlapping, semi-transparent squares in various shades of green, creating a textured, geometric effect.

MANUTENÇÃO DE EQUIPAMENTOS



5. MANUTENÇÃO DE EQUIPAMENTOS

O laboratório deve estar equipado com todos equipamentos necessários para prestação de serviços. Estes equipamentos devem estar operacionais e ser utilizados por pessoas autorizadas e treinadas. Os equipamentos devem ser sujeitos a procedimentos de manutenção periódica de forma a garantir a sua operacionalidade e segurança, incluindo a do utilizador.

Abaixo estão descritos os procedimentos de manutenção para os principais equipamentos necessários para a realização da baciloscopia e GeneXpert.

5.1. Microscópio

A manutenção preventiva é feita diariamente:

- Limpar a poeira do microscópio antes e depois do uso;
- Limpar as objectivas e oculares com papel de lentes;
- Evitar tocar nas lentes;
- Evitar o uso de papel-toalha comum ou gaze para evitar riscos nas lentes;
- Nunca usar detergente, xilol, etanol 96% ou outro solvente para limpeza das lentes. Esses produtos podem retirar a cola que fixa as lentes aos corpos das objectivas e oculares.

5.2. Balança

- Realizar a limpeza exterior e interior para remoção da poeira, antes da pesagem;
- Realizar a limpeza exterior e interior depois do uso;
- Uma vez por ano deverá fazer a calibração da balança por uma empresa qualificada.

5.3. Autoclave

Diariamente:

- Mudar a água do autoclave;
- Usar água destilada no interior do autoclave, ao invés da água da torneira.

Anualmente:

- A inspecção e certificação deve ser realizada por um técnico qualificado. No mínimo, medidores de pressão e termómetros devem ser testados.
- O técnico deve emitir um certificado e um selo de inspecção indicando a conformidade em relação a segurança e bom funcionamento. O selo de inspecção deve ser colado na parte exterior do autoclave.

5.4. Estação de trabalho ventilada

A estação de trabalho ventilada é um equipamento usado com mesmo propósito que a cabine de segurança biológica, ainda que não apresente filtros. A sua instalação deve ser feita por pessoal qualificado obedecendo as regras estabelecidas pelos fabricantes.

Diariamente antes e depois do uso:

- Ligar a estação de trabalho;
- Limpar a superfície de trabalho, as paredes da estação de trabalho e o vidro com hipoclorito de sódio a 0.5 %, deixar 15 minutos, depois limpar da mesma forma com água corrente e depois limpar da mesma forma com álcool a 70%.

5.5. GeneXpert

A manutenção do equipamento GeneXpert deve ser feita de forma regular (diária, semanal,

a) Materiais necessários para manutenção

- Solução de hipoclorito de sódio a 0.5% (preparado diariamente);
- Alcool a 70% ;
- Papel toalha;
- Pincel (fornecido pela Cepheid)
- Luvas descartáveis ;
- Água limpa e sabão (para lavar os filtros);
- Filtros de substituição para a ventoinha (disponíveis na Cepheid)

b) Procedimentos de desinfeção para a área de trabalho

1. Humedeça o papel toalha com a solução de hipoclorito de sódio;
2. Limpe a superfície;
3. Descarte o papel toalha;
4. Aguarde 15 minutos;
5. Humedeça um novo papel toalha, com álcool a 70%;
6. Limpe a superfície;
7. Descarte o papel toalha.

5.5.1. Diária

1 Após os testes, remova os cartuchos do instrumento;

2 Descarte os cartuchos no devido recipiente para resíduos biológicos infecciosos;

3 Remova o lixo da área de trabalho;



4 Feche as portas dos módulos;



5 Desinfecte a área de trabalho.



6 Certifique-se de que existe um espaço livre de 10 cm ao redor do instrumento.

7 Coloque a capa protectora quando o instrumento não estiver a ser utilizado, de modo a reduzir a quantidade de pó no sistema.

8 Registrar a operação de manutenção no formulário correspondente.



1.5.2. Semanal

- 1 Desligue o computador



- 2 Desligue o GeneXpert



.....Aguarde 10 segundos.....

- 3 Ligue o GeneXpert



- 4 Ligue o computador ligado ao GeneXpert



5.5.3. Mensal

a) Limpeza da superfície do instrumento

- 1 Embeba o papel toalha com álcool a 70%;
- 2 Limpe toda superfície externa do instrumento;
- 3 Limpe a superfície da bancada a volta do instrument;



NOTA: Não use o mesmo papel toalha para limpeza do instrumento e superfície da bancada.

b) Limpeza do Compartimento do cartucho

- 3 X {
1. Embeba o papel toalha na solução de hipoclorito;
 2. Limpe o interior do compartimento do cartucho , interior da porta e parte superior da porta;
 3. Espere 2 minutos;
 4. Embeba o papel toalha em álcool a 70%;
 5. Limpe as partes acima descritas com álcool a 70%.

Compartimento interior do cartucho

Interior da porta

Parte superior da porta



c) Limpeza dos êmbolos

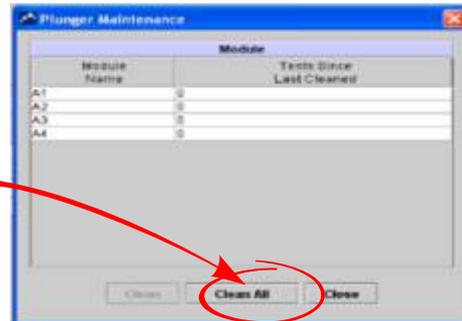
- 3 X
1. Embeba o papel toalha na solução de hipoclorito ;
 2. Após baixar os êmbolos, limpe as gentilmente;
 3. .Espere 2 minutos (nunca mais do que 5 minutos);
 4. Embeba o papel toalha com álcool a 70%;
 5. Limpe os êmbolos com álcool a 70%

1 No menu geral clique em Manutenção (Maintenance)

2 No menu Manutenção, seleccione "Manutenção do êmbolo (plunger maintenance)";

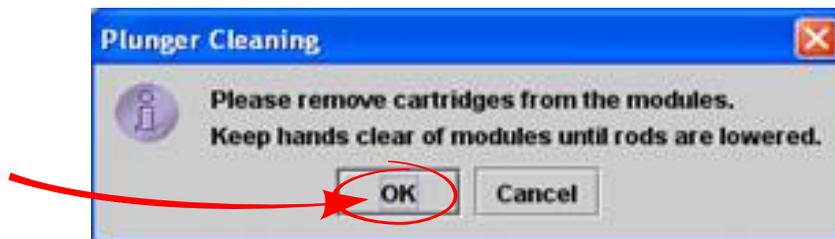


3 Na janela "Manutenção do êmbolo", seleccioneum módulo para limpar ou seleccione "Limpar todos (Clean all)";



4 Siga as instruções na caixa de diálogo;

5 Clique em "OK".



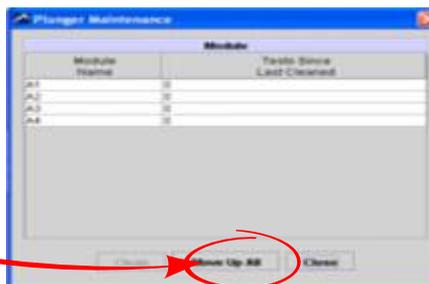
6

A haste dos êmbolos nos módulos baixaram automaticamente. Limpe os êmbolos conforme procedimento acima descrito.



7

Após limpar os êmbolos, clique em "Mover todos para cima (move upall)" e os êmbolos irão regressar à sua posição original.



8

Clique em "Fechar (close)".



a) Limpar o filtro do instrumento

1

Desapertar os 4 parafusos no painel cinzento traseiro do instrumento GeneXpert.



2

Remover a cobertura cinzenta da parte traseira do instrumento.



3

3. Remover o filtro (esponja).



4

Lavar o filtro com sabão e água.

5

Deixar o filtro secar totalmente e, de seguida, coloque-o novamente no instrumento.



e) Limpeza da fenda do módulo onde ocorre a reação de PCR

1

Remover qualquer cartucho no módulo;

2

Inserir completamente as cerdas do pincel na fenda;

3

Pincelar o interior do compartimento com varios movimentos para cima e para baixo torcendo o pincel entre o polegar e o dedo indicador;

4

Limpar todos os módulos por pelo menos 30 segundos.



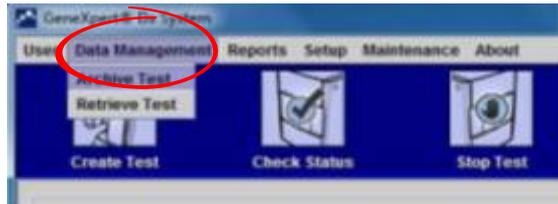
f) Arquivo dos resultado

O arquivo permite-lhe:

- Fazer uma cópia de segurança dos seus dados para garantir que estes não serão perdidos se o computador falhar
- Criar uma cópia dos dados para enviar à Cepheid para assistência na resolução de problemas.

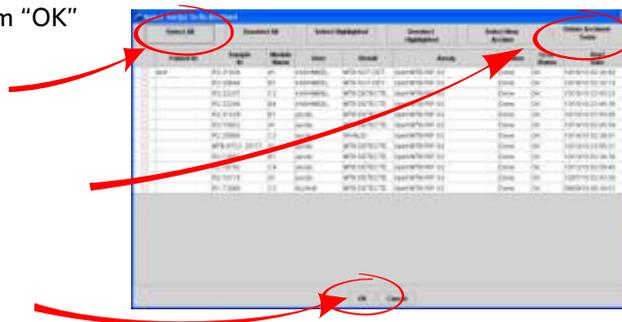
- Os ficheiros devem ser arquivados e guardados num CD ou outro meio externo adequado (de preferência um disco externo) pelo menos uma vez por mês para garantir que os dados dos testes não sejam perdidos.

1 Clicar em gestao de dados ("data management") e, arquivar teste ("archive test")



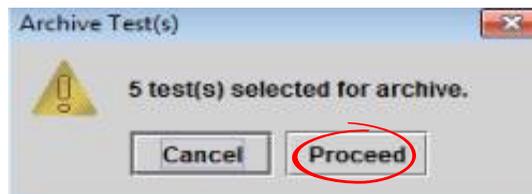
2 Escolher os testes que devem ser arquivados(ou "Seleccionar todos (select all)")

3 Clicar em "OK"

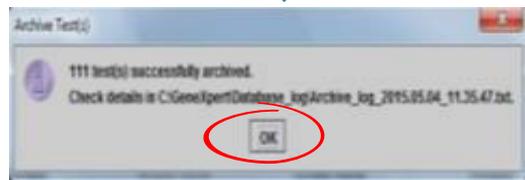
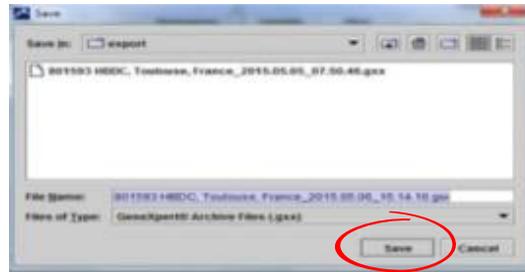


ATENÇÃO!!! Não marque a caixa "Eliminar testes arquivados (delete archivedtests)"

4 Clicar em proceder ("proceed")



- 5 O nome do ficheiro é dado automaticamente, clicar em salvar ("save") e "ok" após a finalizaçãodo arquivo

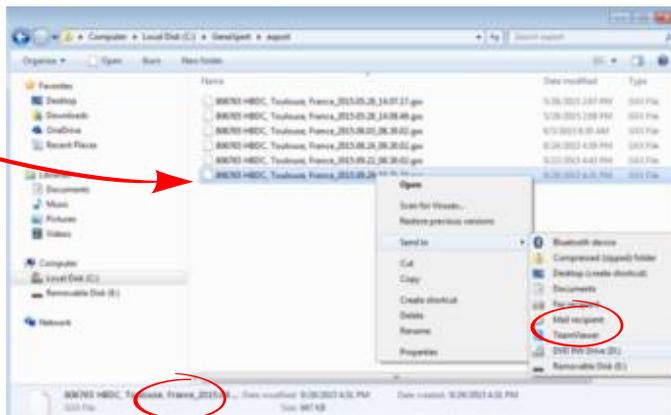


Salvar a informação num CD, Disco Duro Removível ou CD-RW

- 1 Seleccionar o ficheiro arquivado que pretende salvar num CD



- 2 Enviar para DVD RW Drive (D) ou Disco removível



- 3 Enviar para DVD RW Drive (D) ou Disco removível

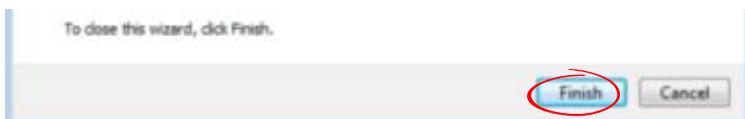
-
- 4 Seleccionar ("Burn to disc, em caso de CD")



-
- 5 Aguardar



-
- 6 Clicar em terminar ("Finish")

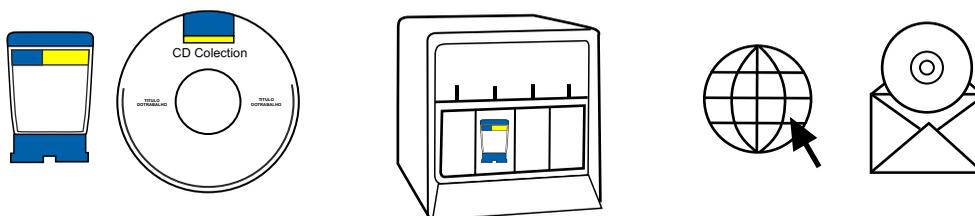


1.5.4. Anual

- Avaliar o desempenho do módulo usando o Xpert® Chek.
- Antes de proceder com o Xpert® Chek, assegurar que a escova fornecida é usada para limpar o local de reacção do PCR no módulo;
- Todos os módulos devem ser verificados todos os anos com cartuchos de XpertChek.



Etapas de calibração



5.6. Referências

WHO (2014), Xpert MTB/Rif implementation manual technical and operational "How-to" practical considerations, Geneva 27, Switzerland

Global Laboratory Initiative (GLI),
http://www.stoptb.org/wg/gli/TrainingPackage_Xpert_MTB_RIF.asp

Cepheid (2016), GeneXpert® & Xpert® Assays: Quick Start Guides, D19277, Rev. B.1, France

