

CRITÉRIO DE ACREDITAÇÃO DA MICROBIOLOGIA EM LABORATÓRIOS MÉDICOS

Preparado por: Comité Consultivo da SADCAS - MLAS	Aprovado por: CEO da SADCAS	Data de aprovação: 2023-02-28 Data de entrada em vigor: 2023-02-28
--	------------------------------------	---

Índice

	Página
1. OBJETO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO	3
2. ABREVIATURAS.....	3
3. REQUISITOS GERAIS E TÉCNICOS.....	3
4. COMUNICAÇÃO DOS RESULTADOS.....	8
5. EQUIPAMENTO DE LABORATÓRIO E REAGENTES.....	9
6. SEGURANÇA LABORATORIAL E ALOJAMENTO & CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	9
7. REFERÊNCIAS.....	10
REGISTO DE ALTERAÇÕES.....	11

1. OBJETO E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O objetivo deste documento é definir os requisitos gerais, técnicos e específicos a serem cumpridos pelos laboratórios no campo da Microbiologia Médica que requerem acreditação de acordo com a ISO 15189.

2. ABREVIATURAS

AST	Teste de sensibilidade antimicrobiana
EPI	Equipamento de proteção pessoal
BSC	Gabinete de Segurança Biológica

3. REQUISITOS GERAIS E TÉCNICOS

3.1.1. O âmbito das atividades do laboratório deve indicar quais dos seguintes serviços são prestados no local e quais não são:

- (i) Bacteriologia
- (ii) Micobacteriologia
- (iii) Micologia
- (iv) Parasitologia
- (v) Testes de suscetibilidade aos medicamentos

3.1.1 Para os procedimentos efetuados no local, o laboratório deve indicar em que medida esses procedimentos de exame são efetuados:

- (i) Exames diretos: Macroscopia/Microscopia
- (ii) Cultura: Aeróbica, Anaeróbica, Micro-aerofílica
- (iii) Identificação: limitada ou extensa
- (iv) Métodos de rastreio
- (v) Métodos de confirmação

3.1.2 Se as amostras forem encaminhadas para outro laboratório para exame completo ou parcial, essas informações devem ser fornecidas pelo laboratório de referência.

3.2 PROCEDIMENTOS DE EXAME:

Devem estar disponíveis procedimentos pormenorizados para o exame direto, cultura, identificação e teste de sensibilidade aos fármacos para cada espécie/organismo a ensaiar, devendo ser tão extensos quanto necessário.

3.2.1 BACTERIOLOGIA

3.2.1.1 Líquido cefalorraquidiano (LCR)

- (i) As amostras de QCA são processadas imediatamente após a sua receção.
- (ii) Deve registar-se o aspeto macroscópico da amostra pura e do sobrenadante.
- (iii) Execute uma contagem diferencial de células.
- (iv) Centrifugar a amostra de LCR e executar a coloração de Gram no depósito.
- (v) A cultura de rotina da amostra deve permitir a recuperação de organismos associados à doença meningea, especialmente os organismos que requerem necessidades de crescimento fastidiosas (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*).
- (vi) Todos os isolados devem ser identificados.
- (vii) Os antígenos bacterianos podem ser detetados usando testes rápidos, como testes de aglutinação em látex.

3.2.1.2 Hemoculturas:

- (i) O tipo de meio de hemocultura deve ser selecionado conforme adequado ao doente e o volume de sangue a utilizar, por exemplo, frascos pediátricos, de resina ou de hemocultura.
- (ii) O meio de hemocultura deve estar à temperatura ambiente antes da inoculação.
- (iii) As hemoculturas não devem ser refrigeradas para transporte e devem ser incubadas a 37°C imediatamente para ajudar na recuperação de:
 - Organismos aeróbios
 - Organismos anaeróbios (quando indicados)
 - Organismo dependente do CO₂
 - Organismos fastidiosos.
- (iv) Hemoculturas manuais do sistema:
 - As garrafas devem ser examinadas diariamente para detetar sinais de crescimento durante o número necessário de dias de incubação.
 - Os frascos devem ser agitados durante as primeiras 24 horas de incubação para uma recuperação ótima dos organismos fastidiosos.

- As culturas negativas devem ser subcultivadas em meios adequados no prazo de 24 horas, após 48 horas, tendo sido realizada uma subcultura terminal.
 - Todos os isolados devem ser identificados.
- (v) Os sistemas automatizados de hemocultura devem seguir as recomendações dos fabricantes para inoculação e incubação.

3.2.1.3 Aspirados, culturas de feridas, tecidos e pus.

- (i) O pus ou tecido inteiro é preferível ao uso de swabs para a coleta de amostras.
- (ii) Devem existir procedimentos especiais para evitar a perda de organismos anaeróbios, por exemplo, a utilização de meios de transporte adequados.
- (iii) As colorações de Gram devem ser efetuadas por rotina e comunicadas.
- (iv) Devem ser utilizados sistematicamente meios de cultura para a recuperação de organismos aeróbios e anaeróbios.
- (v) Se for caso disso, devem ser utilizados meios e métodos seletivos para recuperar anaeróbios estritos.

3.2.1.4 Isolamento anaeróbio

- (i) As amostras para exame anaeróbio devem dispor de disposições adequadas para evitar ou minimizar a exposição ao oxigénio.
- (ii) Todos os espécimes para anaeróbios devem ser transportados num meio de transporte adequado.
- (iii) Deve especificar-se o método utilizado para obter um ambiente de cultura anaeróbia, por exemplo, jarra anaeróbia.
- (iv) As culturas em meio sólido devem ser colocadas imediatamente num ambiente anaeróbio.
- (v) Deve especificar-se o meio líquido utilizado para os anaeróbios, ou seja, caldo de tioglicolato e meio de carne cozida.
- (vi) Deve ser indicado o método utilizado para controlar a qualidade do ambiente anaeróbio (organismo de controlo, indicadores anaeróbios comerciais).
- (vii) O teste de suscetibilidade à difusão em disco normalmente não é feito, pois não há diretrizes CLSI disponíveis, métodos alternativos, por exemplo, teste E, diluição em caldo ou métodos de diluição em ágar.
- (viii) Os organismos de controlo devem ser testados com cada lote de testes de sensibilidade efetuados.

3.2.1.5 Amostras respiratórias

- (i) Ao realizar culturas de expetoração, devem ser tomadas todas as medidas para obter uma amostra "verdadeira" de expetoração.
- (ii) As amostras de expetoração devem ser avaliadas antes da cultura.
- (iii) Devem estar disponíveis procedimentos para a identificação de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

- (iv) Quando indicado, devem ser identificados outros bacilos gram-negativos.
- (v) Devem existir procedimentos adequados para o isolamento e a identificação de outros agentes patogénicos, ou seja, *Staphylococcus aureus*, espécies de *Cryptococcus* e *Candida albicans*.

3.2.1.6 Amostras de urina

- (i) Sempre que possível, as amostras de urina devem ser examinadas no prazo de 2 horas após a micção ou refrigeradas, se tal não for possível.
- (ii) Devem ser realizadas contagens quantitativas ou qualitativas de células, culturas e colónias.
- (iii) Os meios de cultura utilizados devem permitir o isolamento e a identificação de organismos gram positivos e negativos.
- (iv) Quando apropriado, devem ser examinadas amostras de urina com grandes quantidades de glóbulos vermelhos para deteção da presença de óvulos de Bilharzia (*Schistosoma haematobium*).

3.2.1.6.1 Amostras fecais e esfregaços rectais

- (i) Devem ser utilizados procedimentos de rotina que permitam o rápido isolamento e identificação de agentes patogénicos entéricos em doentes com diarreia e de portadores assintomáticos
- (ii) O enriquecimento e os meios seletivos devem permitir a recuperação de um pequeno número de agentes patogénicos entéricos.
- (iii) Quando indicado, devem estar disponíveis procedimentos para a recuperação das seguintes bactérias:
 - *Vibrio cólera*
 - *Yersinia enterocolitica*
 - Espécies de *Campylobacter*. (condições de cultura microaerofílica)
 - Espécies de *Aeromonas*

3.2.1.6.1 Culturas de Swab para *Neisseria gonorrhoeae*:

- (i) As amostras cervicais, uretrais ou outros tipos de amostras adequados devem ser inoculadas diretamente em meios seletivos adequados ou submetidas num meio de transporte adequado que permita uma recuperação ótima dos organismos.
- (ii) Os meios de cultura e os meios de inoculação e incubação devem ser ótimos para o isolamento de *Neisseria*.

3.2.2 PARASITOLOGIA:

- (i) Deve estar disponível na zona de trabalho um manual de procedimentos que inclua instruções para a colheita adequada de amostras, os métodos utilizados e os critérios para a identificação de óvulos e parasitas.
- (ii) As amostras devem ser examinadas no estado fresco, especialmente para detetar a presença de trofozoítos.
- (iii) Se as amostras não puderem ser examinadas imediatamente, devem ser tomadas medidas para preservar a amostra, por exemplo:
 - a. Preparação húmida direta com ou sem coloração de iodo.
 - b. Um procedimento de concentração reconhecido.
 - c. Preparação corada permanentemente (por exemplo, coloração com hemotoxilina)
 - d. Coloração de Ziehl Neelsen modificada para *Cryptosporidia*.
- (iv) Se disponível, pode utilizar-se um micrómetro ocular calibrado para determinar o tamanho dos óvulos, larvas, quistos ou trofozoítos.
- (v) O material de referência deve estar disponível na bancada de trabalho e deve incluir
 - a. Atlas impresso de parasitas e óvulos.
 - b. Ilustrações e descrições semelhantes
 - c. Montagens e corrediças permanentes
- (vi) Aplica-se às películas de sangue para *Plasmodium*:
 - a. Devem ser feitas e examinadas películas grossas e finas
 - b. Devem ser imediatamente preparados filmes a partir de sangue venoso anticoagulado.
 - c. Deve ser utilizado um método de coloração adequado, por exemplo, as colorações de Wright e Giemsa.
 - d. Deve verificar-se o pH do tampão utilizado para as manchas, ou seja, 7.2.
 - e. No caso das películas espessas, devem examinar-se pelo menos 100 campos antes de ser apresentado um relatório sobre a ausência de parasitas.
 - f. A % de parasitemia deve ser estabelecida.

3.2.2.5 MICOLOGIA

Técnicas de isolamento e identificação.

- (i) O laboratório deve realizar procedimentos de rastreio preliminares, tais como preparações húmidas diretas e manchas.
- (ii) Deve utilizar-se meios de cultura seletivos adequados (por exemplo, DTM ou Mycosel) para o crescimento e isolamento de dermatófitos e micoses sistémicas.
- (iii) Devem ser adicionados antibióticos aos meios de cultura para suprimir o crescimento de contaminantes bacterianos e fúngicos.
- (iv) Os intervalos de temperatura para os testes de crescimento, isolamento e diferencial para dermatófitos e micoses sistémicas devem ser definidos nos métodos de cultura.

- (v) Devem ser utilizados procedimentos adequados para os testes diferenciais utilizados para a identificação de fungos no que diz respeito ao tipo de trabalho realizado pelo laboratório, os quais devem incluir:
- a. Ensaios bioquímicos manuais e/ou automatizados
 - b. Formação de clamídiadiósporos
 - c. Requisitos específicos de crescimento da temperatura
 - d. Cultura de slide/bloco

3.2.4 MICOBACTERIOLOGIA:

Procedimentos de diagnóstico.

- a) A triagem de amostras pode incluir microscopia de TB, teste GeneXpert ou Line Probe Assay (LPA).
- b) Devem ser utilizados métodos de coloração adequados, tais como Ziehl Neelsen, Fluorescência ou Kinyoun.
- c) Devem ser incluídos controlos positivos e negativos em todos os lotes aquando da realização de microscopias, culturas ou testes de sensibilidade aos medicamentos.
- d) Utilizar-se-á um processo de descontaminação para preparar as amostras para a cultura da tuberculose. O tipo de descontaminante a utilizar deve ser indicado no procedimento.
- e) Deve indicar-se o método de concentração utilizado para a microscopia e a cultura de micobactérias em amostras de expetoração e não de expetoração.
- f) Deve indicar-se a utilização de meio de cultura específico para isolamento primário (para sistemas manuais ou automatizados)
- g) Deve ser claramente indicada a duração da incubação das culturas antes da emissão de um relatório negativo.
- h) Todos os isolados micobacterianos suspeitos devem ser verificados quanto à sua solidez ácida.
- i) Proceder-se-á à identificação das espécies e especificar-se-á o(s) método(s) utilizado(s).
- j) As estirpes de referência devem ser mantidas como controlos para a identificação e os testes de suscetibilidade.
- k) Devem ser efetuados testes de sensibilidade em todos os isolados relevantes de MTB, utilizando um método aprovado.

3.2.5 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (AST):

- a) Tipos de testes de suscetibilidade:
 - I. Teste de suscetibilidade discal, ou seja, método de Kirby Bauer.
 - II. Concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, microdiluição em caldo, ETEST.®
 - III. Os ensaios de previsão da resistência ao *Staphylococcus* à oxacilina (resistência mediada por *mecA*) devem ser efetuados de acordo com um método especificado.
- b) Controle de qualidade de AST:

- I. As estirpes reconhecidas de controlo de qualidade de suscetibilidade conhecida devem ser testadas pelo menos semanalmente, de acordo com as diretrizes do CLSI (ou outras organizações reconhecidas internacionalmente, por exemplo, EUCAST).
- II. Deve ser utilizado um inóculo normalizado.
- III. No caso do disco AST, devem ser medidas, registadas e utilizadas as dimensões específicas das zonas do organismo de controlo para determinar a sensibilidade ou resistência do agente antimicrobiano.
- IV. Para os ensaios de diluição em caldo, deve ser imposta a concentração e a identidade de todas as drogas diluídas.
- V. Qualquer AST que não tenha passado no controlo de qualidade não deve ser notificada relativamente aos resultados dos doentes até que se demonstre que passa pelo CQ durante um período de, pelo menos, 5 dias consecutivos.

4.0 COMUNICAÇÃO DOS RESULTADOS:

4.1 Bacteriologia

- a) Os relatórios preliminares devem ser emitidos quando os resultados finais não estiverem disponíveis no prazo de 48 horas.
- b) Os resultados finais negativos devem estar normalmente disponíveis no prazo de 48-72 horas (dependendo do tipo de amostra)
- c) Os resultados de suscetibilidade ao medicamento devem ser comunicados como sensíveis ou resistentes.
- d) Devem ser comunicados os valores dos ensaios MIC, bem como a interpretação.

4.2 Micologia:

- a) Os resultados preliminares dos exames microscópicos devem ser disponibilizados aos clínicos requerentes.
- b) Os resultados finais devem estar disponíveis no prazo de 4 a 6 semanas.

4.3 Micobacteriologia:

- a) O exame microscópico de BAAR das amostras deve indicar a quantidade de BAAR no esfregaço de acordo com as diretrizes da IUAT.
- b) Se for caso disso, o relatório deve fazer referência a espécimes em quantidade e qualidade inadequadas
- c) Os relatórios de microscopia e GeneXpert devem ser emitidos no prazo de 24 horas após a receção da amostra.
- d) Devem ser emitidos resultados intercalares para espécimes positivos para cultura.

5.0 EQUIPAMENTO DE LABORATÓRIO E REAGENTES

5.1. Equipamento

- a. O laboratório deve estar equipado com todo o equipamento necessário para a prestação dos serviços.
- b. O equipamento deve ser verificado aquando da instalação e antes da utilização.
- c. Os equipamentos devem ser rotulados de forma única.
- d. O manual do operador ou o SOP devem estar disponíveis e devem ser operados por pessoal treinado/autorizado.
- e. Os registos de cada equipamento devem ser mantidos de acordo com a norma ISO.
- f. O laboratório deve dispor de um procedimento documentado para a calibração do equipamento (SADCAS TR 09: Critérios para a realização da calibração e verificações intermédias do equipamento utilizado em instalações acreditadas)
- g. Os laboratórios que realizam testes de cultura de TB devem ter um gabinete de segurança biológica (BSC).
- h. Os laboratórios que preparam internamente reagentes e meios de cultura devem dispor do seguinte equipamento:
 - Equilíbrio
 - Medidor de pH e tampões.
 - Autoclave (tamanho adequado à carga de trabalho)

5.2. Reagentes/consumíveis

- a) O laboratório deve dispor de um procedimento documentado para a receção, armazenagem, ensaios de aceitação e gestão de inventário de reagentes e consumíveis.
- b) Devem ser mantidos registos de cada reagente/consumível que contribua para a realização dos ensaios.
- c) Se o laboratório preparar internamente reagentes ou meios de cultura, os registos devem incluir a(s) pessoa(s) responsável(eis) pela preparação, data de preparação, data de validade, bem como os testes de aceitação.

6.0 SEGURANÇA LABORATORIAL E CONDIÇÕES AMBIENTAIS:

- a) Os equipamentos de proteção individual (EPI) devem estar disponíveis e ser adequados à classe de organismos manuseados. Devem incluir, no mínimo, luvas, máscaras, óculos de proteção e casacos de laboratório.
- b) As amostras e técnicas de cultura que envolvam organismos das classes III e IV, por exemplo, micobactérias, agentes patogénicos fúngicos sistémicos, ou seja, Histoplasma, devem ser sempre manuseadas num BSC adequado.
- c) As centrífugas devem poder conter aerossóis bioperigosos e derrames, ou seja, baldes de centrifugação com tampas.
- d) Devem estar disponíveis desinfetantes adequados na zona de trabalho.
- e) Os laboratórios devem dispor de espaço suficiente para permitir que os trabalhos sejam realizados com segurança e competência.
- f) O BSC deve ser verificado diariamente/semanalmente ou quando em uso para garantir o bom funcionamento.

- g) Deve haver uma separação adequada das atividades ao realizar o teste de TB no ambiente laboratorial.

7.0 REFERÊNCIAS

- ISO 15189: Laboratórios médicos – Requisitos particulares de qualidade e competência
- SADCAS TR 09: Critérios para a realização de calibração e verificações intermédias em equipamentos utilizados em instalações acreditadas.

APÊNDICE - REGISTO DE ALTERAÇÕES

Status da revisão	Alteração			Aprovado por	Data de Entrada em Vigor
	Página	Cláusula/Subcláusula	Descrição da Alteração		
Nº 1	-	-	-	Diretor-Presidente	2023-02-28