

Susana de Lurdes Dias Morgado

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dra. Arminda Gonçalves e pela Professora Doutora Olga Maria Cardoso, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Susana de Lurdes Dias Morgado

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dra. Arminda Gonçalves e pela Professora Doutora Olga Maria Cardoso, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

Agradecimentos

Momentos houve em que me senti desiludida e sem forças, por isso, quero deixar algumas palavras de agradecimento às pessoas que acreditaram e me fizeram continuar.

Primeiramente agradeço à Professora Doutora Leonor Almeida, Coordenadora do Mestrado de Análises Clínicas, pelo apoio, motivação e confiança, que demonstrou ao longo destes anos de mestrado.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Sousa Martins – ULS da Guarda, que me acolheu na primeira fase desta caminhada, uma fase de maior turbulência e, por isso, peço-lhes desculpa pela minha falta de tempo.

Agradeço ao Dr. Carlos Cortes, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do CHMT, por ter permitido a realização deste estágio no seu serviço.

À Dra. Arminda Gonçalves por toda a disponibilidade, conhecimento e orientação que demonstrou ao longo do estágio.

À Professora Doutora Olga Cardoso pela ajuda e colaboração na melhoria do relatório.

À minha família, pelos valores que me transmitiram e que fazem de mim a pessoa que sou. O apoio e a confiança que depositaram em mim desde o início.

Aos meus amigos, alguns companheiros de jornada, agradeço pela paciência, força e motivação. Não posso deixar de referir o apoio e a confiança de uma amiga em particular, a Ana Augusto, que conheci durante este período, e que desde o início acreditou em mim. O meu sincero Obrigada. Além disso, quero deixar um agradecimento a uma pessoa especial, pelo companheirismo, carinho, apoio, força e motivação que sempre me deu, mesmo quando o meu feitio já não era o melhor. Tornaram esta caminhada mais fácil.

Às pessoas com quem tive a oportunidade de trabalhar no Serviço de Patologia Clínica do CHMT agradeço o conhecimento que me transmitiram e a paciência que tiveram para me ensinar.

Índice

Índice de Figuras	IX
Índice de Gráficos	X
Índice de Ilustrações	XI
Índice de Tabelas	XII
Lista de Abreviaturas	XIII
Resumo	XVII
Abstract	XIX
1. INTRODUÇÃO	I
2. CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA	2
2.1 Setor de Microbiologia	6
i) Urina	7
ii) Hemoculturas	10
iii) Ponta de Cateter	13
iv) Fezes	14
v) Aparelho Respiratório Superior	21
vi) Aparelho Respiratório Inferior	23
vii) Exsudado ocular, ouvidos e feridas	24
viii) Aparelho Genital	25
ix) Outros líquidos biológicos	27
EXAME MICOBACTERIOLÓGICO	29
PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO	32
PROVA DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	34
CONTROLO DE QUALIDADE	37
2.2 Setor de Imunologia	39
2.2.1 Equipamentos, princípios de funcionamento e técnicas manuais	39
Immage 800	39
Autoanalizador VIDAS	40
Autoanalizador Unicel Dxl 800	41
ImmunoCAP™ 250	41
EUROBlotMaster	42
Autoanalizador Mago Plus	42
Autoanalizador Access 2	44
Sebia Hydrasys®	44
2.2.2 Autoimunidade	45
i) Pesquisa de Anticorpos antinucleares (ANA)	47
ii) Doenças Autoimunes – Casos representativos	54
Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)	54
Esclerose Sistémica (ES)	57
2.3 Setor de Bioquímica	60
2.4 Setor de Hematologia	62
Controlo de Qualidade dos Setores de Imunologia/ Bioquímica e Hematologia	64
3. CONCLUSÃO	65
4. BIBLIOGRAFIA	67

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da Identificação Bacteriana	6
Figura 2. Cultura positiva de uma amostra de urina em Meio CLED	9
Figura 3. Subcultura em GS de 2 pares de hemoculturas positivas para <i>Escherichia coli</i> , do mesmo doente	12
Figura 4. (a.)Cultura positiva de ponta de cateter, semeada em GS pelo método de Maki (b) para <i>Escherichia coli</i>	13
Figura 5. Meio HEK inoculado com amostra de fezes positiva para <i>Shigella spp.</i>	15
Figura 6. Meio YER CIN inoculado com amostra de fezes positiva para <i>Yersinia enterocolitica</i>	15
Figura 7. Cultura em meio CAMPY de uma amostra de fezes, positiva para <i>Campylobacter Jejuni</i>	16
Figura 8. Gram de colónia de uma cultura em meio CAMPY de uma amostra de fezes, sugestivo de <i>Campylobacter spp.</i>	16
Figura 9. Representação de um resultado positivo do teste de pesquisa da GDH de <i>Clostridium difficile</i> utilizando o teste H&R <i>Clostridium difficile</i> GDH	17
Figura 10. Observação microscópica de adulto fêmea de <i>Enterobius vermicularis</i> com ovos em amostra de fezes de uma criança	18
Figura 11. Representação dos possíveis resultados do teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes utilizando o Chemtrue® teste one-step FOB	19
Figura 12. Meio de cultura chromo ID MRSA SMART inoculado com um exsudado nasal positivo para <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente	22
Figura 13. Esfregaço de uma expetoração, corado por Gram, de boa qualidade: elevado número de leucócitos e flora bacteriana abundante (cocos Gram positivo)	23
Figura 14. Esfregaço de uma expetoração, corado por Gram, de má qualidade: elevado número de células epiteliais	23
Figura 15. Meio de cultura CAN inoculado com uma amostra de exsudado vaginal positiva para <i>Cândida albicans</i> (a.) <i>Candida tropicalis</i> (b.)	26
Figura 16. Meio de cultura Chrom ID STRB inoculado com uma amostra de exsudado vaginal rectal positiva para <i>Streptococcus agalactiae</i> Grupo B	26
Figura 17. Subcultura de cocos Gram positivo em meio de cultura MSA positiva para <i>Staphylococcus aureus</i>	28

Figura 18. Subcultura em meio CNA, a partir de uma hemocultura, com isolamento de cocos Gram positivo	28
Figura 19. Fluxograma de processamento de amostras para o isolamento de micobactérias	29
Figura 20. Esfregaço de uma cultura positiva para BAAR, corado pela técnica de Ziehl Neelsen modificado (método de Kinyoun) obtida de um aspirado brônquico	31
Figura 21. Exame a fresco com contraste negativo por tinta-da-china de colónias em subcultura GS, obtida a partir de uma hemocultura positiva para <i>Cryptococcus neoformans</i>	33
Figura 22. <i>Klebsiella pneumoniae</i> em meio Chromo ID CARBA	36
Figura 23. Image 800 da Beckman Coulter	39
Figura 24. Autoanalisador VIDAS da Biomérieux	40
Figura 25. Unicel Dxl 800 da Beckman Coulter	41
Figura 26. ImmunoCAP™ 250 da ThermoFisher Scientific	41
Figura 27. EUROBlotMaster da EUROIMMUN	42
Figura 28. Protocolo EUROLineScan	42
Figura 29. Mago Plus da Diamedix (Isoder)	42
Figura 30. Figura representativa da técnica de IFI no Mago Plus	43
Figura 31. Figura representativa da técnica de ELISA no Mago Plus	44
Figura 32. Access 2 da Beckman coulter	44
Figura 33. Sebia Hydrasis da ThermoFischer	44
Figura 34. Esquema representativo dos métodos específicos (Elisa e Immunoblotting e respetivos antígenos)	52
Figura 35. As manifestações características de LES	54
Figura 36. Algoritmo de orientação do diagnóstico de LES	56

Índice de Gráficos

Gráfico I. Distribuição de análises realizadas por setor no ano de 2015	3
---	---

Índice de Ilustrações

Ilustração 1. Esquema representativo de ensaio nefelométrico e turbidimétrico realizado pelo Immage 800	40
Ilustração 2. Representação esquemática do Imunoensaio não competitivo sanduíche para detecção de Ac realizado no Autoanalisador VIDAS	40
Ilustração 3. Esquema representativo do Imunoensaio Fluoroenzimático realizado pelo Unicap 250	41
Ilustração 4. Esquema representativo da técnica de Immunoblotting realizada pelo EUROBlotMaster	42
Ilustração 5. Esquema representativo da técnica IFI realizada pelo Autoanalisador Mago Plus	43
Ilustração 6. Esquema representativo da técnica de ELISA realizada pelo Autoanalisador Mago Plus	43
Ilustração 7. Esquema representativo da Etiopatogenia multifatorial das Doenças Autoimunes. Mosaico da Autoimunidade: Fatores de Risco para o desenvolvimento de Doença Autoimune	46
Ilustração 8. Diagrama representativo da complexidade na interpretação do resultado positivo de ANA	49
Ilustração 9. Representação Esquemática do núcleo celular em interfase e exemplos de imunoglobulinas que reagem contra componentes nucleares e citoplasmáticos	49
Ilustração 10. Algoritmo de orientação da determinação de ANA	53

Índice de Tabelas

Tabela I. Equipamentos existentes no SPC do CHMT.....	5
Tabela II. Volumes de sangue adaptados ao peso e à idade das crianças	11
Tabela III. Conservação das amostras de fezes para pesquisa de <i>Clostridium difficile</i> ...	17
Tabela IV. Principais infecções bacterianas do Aparelho Respiratório Superior e respetivo agente patogénico	21
Tabela V. Carta de ID e TSA utilizada para determinado microrganismo e indicação da turvação necessária na suspensão para a realização dos mesmos no sistema <i>Vitek2® compact</i>	34
Tabela VI. Painéis de ID e suscetibilidade aos antimicrobianos para diferentes microrganismos no sistema MicroScan Walkway 96.....	35
Tabela VII. Programas de AEQ no setor de Microbiologia	38
Tabela VIII. Algumas doenças auto imunes sistémicas e específicas de órgão	46
Tabela IX. Algumas doenças auto imunes sistémicas e seus antigénios	47
Tabela X. Principais anticorpos nas doenças auto imunes específicas de órgão	47
Tabela XI. Prevalência dos ANA nas doenças auto imunes	48
Tabela XII. Padrões característicos de fluorescência ANA	51
Tabela XIII. Auto anticorpos marcadores específicos de LES	55
Tabela XIV. Prevalências de AAcS anti Ags específicos de ES	59
Tabela XV. Equipamentos do setor de Bioquímica com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respetivos valores de referência	60
Tabela XVI. Equipamentos do setor de Hematologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respetivos valores de referência	62
Tabela XVII. Programas de AEQ da Autoimunidade	64

Abreviaturas

- A - Ambos
- Ac - Anticorpo
- Acs - Anticorpos
- ADA - Adenosina Desaminase
- Ag - Antígeno
- Ags - Antígenos
- ADN - Ácido Desoxirribonucleico
- AEQ - Avaliação Externa da Qualidade
- ALP - Fosfatase Alcalina
- ALT - Alanina Amino transferase
- AMA M2 - Anticorpos Anti Mitocôndria fração M2
- ANA - Anticorpos Antinucleares
- ANC - Anaeróbios e *Corynebacterium*
- ANCA - Anticorpos Anti-citoplasma do Neutrófilo
- aPTT - Activated Partial Thromboplastin Time
- AR - Artrite Reumatoide
- ARC - Colégio Americano de Reumatologia
- ASMA - Anticorpos Anti Músculo Liso
- AST - Aspartato Aminotransferase
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- AAcs - Autoanticorpos
- AAgs - Autoantígenos
- BAAR - Bacilos ácido - álcool resistentes
- BHI - Caldo de enriquecimento universal “Brain Heart Infusion”
- CAN - Gelose cromogénica para identificação de *Candida albicans*
- CAMPY- *Gelose Campyloset*
- CARB - Carbapenemases
- CBP - Cirrose Biliar Primária
- CLED - Cistina, lactose, défice em eletrólitos
- CH - Colite Hemorrágica
- CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CHMT - Centro Hospitalar Médio Tejo
- CK - Creatinina Cinase
- CK MB - Creatinina Cinase MB
- CMI - Concentração Mínima Inibitória
- CNA - Meio Colistina e Ácido nalidíxico
- CQI - Controlo de Qualidade Interno
- CREST - Síndrome de CREST (Calcinose, Raynaud, Dismotilidade Esofágica, Esclerodactilia, Telangectasia)
- DAI - Doença Autoimune
- DAIs - Doenças Autoimunes
- DGS - Direção Geral de Saúde
- DM - Dermatomiosite
- DMTC - Doença Mista do Tecido Conjuntivo
- DST - Doenças sexualmente transmissíveis

- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- dsDNA - Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla
- EDTA K3 - Ácido Etilenodiaminotetracético Tripotássio
- ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay*
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ENA - Antígenos extraíveis do Núcleo
- EPC - Enterobacteriaceae produtoras de Carbapenemases
- ES - Esclerose sistêmica
- EUCAST - *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- EUROIMMUN - Medizinische Labordiagnostika AG
- F - Feminino
- F vW - Fator von Willebrand
- GDH - Glutamato Desidrogenase
- GGT - Gama Glutamil Transferase
- GN - Gram negativo
- GP - Gram positivo
- gp210 - Glicoproteína de 210KDa
- GS - Gelose de Sangue
- HAE - Gelose seletiva para bactérias do Género *Haemophilus* e *Neisseria*
- HAI - Hepatite Auto imune
- Hb A1C - Hemoglobina Glicada
- Hb F - Hemoglobina Fetal
- HCl - Ácido clorídrico
- HCM - Hemoglobulina Corpuscular Média
- HEK - Gelose Hecktoen, seletiva e diferencial para Bactérias do Género *Salmonella* e *Shigella*
- HEp2 - Células do Carcinoma Laríngeo Humano tipo 2
- ID - Identificação
- IFI - Imunofluorescência Indireta
- IgA - Imunoglobulina A
- IgG - Imunoglobulina G
- IgM - Imunoglobulina M
- INR - International Normalized Ratio
- INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
- INSTAND - Society for Promoting Quality Assurance in Medical Laboratories
- KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases
- LCR - Líquido Cefalorraquídeo
- LDH - Lactato Desidrogenase
- LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico
- M - Masculino
- MAC - Gelose MacConkey, seletiva para Bactérias Gram negativo e diferencial para Bactérias fermentadoras da lactose
- MI - Miopatia inflamatória
- MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
- MSA - Meio Manitol Salgado
- NA - Não Aplicável
- NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina, em inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*
- NALC - N-Acetil-L-Cisteine

- NDM - New Delhi metallo-β-lactamase
- NH - *Neisseria e Haemophilus*
- PCNA - Autoanticorpo Anti ciclina
- PCR - Real Time–Polymerase Chain Reaction
- PCR - Proteína C Reativa
- PDGFR - Recetor do Fator de Crescimento derivado das plaquetas
- PDW - Platelets Distribution Width
- PVX - *PolyViteX*
- RDW - Red Cell Distribution Width;
- RIQAS - Randox Laboratories Limited
- Rpm - Rotações por minuto
- RNA - Ácido Ribonucleico
- SAF - Síndrome Antifosfolipídico
- SI - Sistema Imunitário
- Sm - Smith
- SS - Síndrome de Sjögren
- SUH - Síndrome Urémica Hemolítica
- Sp100 - Proteína ácido solúvel de 100 KDa
- SPC - Serviço de Patologia Clínica
- STRB - Gelose cromogénea para identificação de *Streptococcus agalactiae* (Grupo B)
- Topo I - Topoisomerase I
- TP - Tempo de protrombina
- TSA - Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
- UKNEQAS - United Kingdom National External Quality Assessment Service
- UFC - Unidade Formadora de Colónia
- ULS - Unidade Local de Saúde
- VCAT - Gelose seletiva para bactérias do Género *Neisseria*
- VCM - Volume Corpuscular Médio
- VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana
- VT - Verocitotoxina
- VPM - Volume Plaquetar Médio
- YER - *Yersinia*
- YST - Fungos

Resumo

Com o presente relatório de estágio realizado, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, nos Serviços de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Sousa Martins – Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda e Centro Hospitalar Médio Tejo (CHMT) – Unidade Hospitalar de Tomar, pretende-se descrever todas as atividades desenvolvidas.

Após uma breve introdução às instituições de acolhimento e descrição dos objetivos, será realizada a caracterização do SPC do CHMT, onde tive a oportunidade de colocar em prática, desenvolver e aprofundar, os saberes e conhecimentos adquiridos durante a frequência do mestrado.

O Estágio englobou as diferentes áreas laboratoriais, nomeadamente a Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia.

Em termos estruturais, será caracterizada a organização e funcionamento do Serviço, os equipamentos existentes e os princípios das metodologias utilizadas. Serão descritas com maior pormenor as atividades desenvolvidas e parâmetros analíticos executados nas áreas da Microbiologia e Imunologia.

Será ainda descrito o controlo de qualidade realizado nestes setores, uma atividade que contribui para garantir que as determinações realizadas sejam credíveis e fiáveis.

Palavras-chave: Imunologia, Microbiologia, Patologia Clínica.

Abstract

With this internship report I intend to describe all the activities developed in the Clinical Pathology Services of Hospital Sousa Martins and Middle Tejo Hospital Center – Tomar Hospital, undertaken within the Masters in Clinical Analysis of Faculty of Pharmacy - University of Coimbra.

After a brief introduction to the host institutions and description of the objectives, it will be performed the characterization of the Clinical Pathology Services of Middle Tejo Hospital Center – Tomar Hospital, where I had the opportunity to put into practice, develop and deepen the knowledge and skills acquired during the attendance of the master degree.

Internship included the different laboratory areas, such as Hematology, Microbiology, Biochemistry and Immunology.

Structurally, it will be characterized the organization and operation of the service, the existing equipment and the principles of the methodologies used. It will be described in greater detail the activities and analytical parameters performed in the areas of Microbiology and Immunology.

It will also be described the quality control carried out in these areas, an activity that helps to ensure that the decisions made are credible and reliable.

Keywords: Immunology, Microbiology, Clinical Pathology.

I. INTRODUÇÃO

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra disponibiliza uma formação especializada nas várias valências da área do diagnóstico laboratorial. O seu plano de estudos contempla um estágio, que permite, não só, a consolidação dos conhecimentos adquiridos, mas também a aquisição de novas competências, que nos preparam para integrar a rotina Laboratorial de um SPC.

O CHMT, situado na Av. Maria de Lourdes de Mello Castro, em Tomar, integra três Unidades Hospitalares, Abrantes, Tomar e Torres Novas, e a sua área de influência engloba 15 Concelhos do Distrito de Santarém, dando cobertura a uma população de aproximadamente 150 000 habitantes.

O SPC, centralizado na Unidade de Tomar, desde 2010, constitui um dos muitos serviços que o CHMT tem ao dispor dos seus utentes e encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Carlos Cortes, Médico Assistente Hospitalar de Patologia Clínica. Sempre a pensar no bem-estar dos doentes, o SPC tem como objetivo obter respostas atempadas que dignifiquem a necessidade do doente e ajudem o clínico no seu diagnóstico, controlo e monitorização.

O relatório apresentado refere-se ao estágio realizado no SPC do CHMT – Unidade Hospitalar de Tomar, que teve a duração de 400 horas. As primeiras 200 horas do estágio, num total de 600 horas, foram realizadas no SPC do Hospital Sousa Martins da Guarda, onde foi possível obter um conhecimento geral de um laboratório de análises clínicas, nas suas várias áreas analíticas.

A ULS da Guarda, criada em Outubro de 2009, integra os Hospitais Sousa Martins (Guarda), Nossa Senhora da Assunção (Seia) e doze centros de saúde do distrito da Guarda, com exceção de Aguiar da Beira e Vila Nova de Foz Coa. O projeto tem um âmbito distrital e pretende melhorar a prestação de cuidados de saúde, o diagnóstico, o tratamento e a reabilitação da saúde na região da Guarda e dos seus 171 000 habitantes.

O SPC do Hospital Sousa Martins, sob a responsabilidade da Dra. Fátima Vale, está acreditado e organizado em 4 áreas analíticas: Microbiologia, Hematologia, Bioquímica, Imunologia.

Recebe amostras biológicas provenientes da consulta externa, do internamento e das urgências. Para além destas, chegam ainda ao laboratório amostras provenientes de outros laboratórios, hospitais e centros de saúde.

No âmbito do estágio realizado no SPC do CHMT tive a oportunidade de passar por todas as áreas analíticas do laboratório, nomeadamente Microbiologia, Hematologia, Bioquímica Clínica e Imunologia.

Foi uma experiência, que me permitiu consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado e a obtenção de novos saberes. Para isso, contei com o apoio extraordinário de todos os elementos do SPC do CHMT. Além do contributo para a minha experiência profissional, o contacto diário com o meio hospitalar fez-me crescer, enquanto pessoa. Foi uma experiência bastante gratificante.

Depois de uma breve abordagem a todos os setores, para integração na rotina diária do laboratório, escolhi desenvolver e aprofundar, neste relatório, os setores da Microbiologia e da Imunologia. A Microbiologia um fascínio, desde sempre, um mundo nem sempre visível a olho nu, mas que assume um papel muito importante nas nossas vidas. A Imunologia, um mundo deslumbrante, que se tem revelado uma arma poderosa na decisão do clínico.

2. CARACTERIZAÇÃO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA

Para prestar um serviço de qualidade que garanta as necessidades de todos os doentes, o Serviço possui uma equipa de profissionais competentes, constituída por 2 Médicos Patologistas Clínicos, 6 Técnicos Superiores de Saúde, 2 Técnicos Superiores, 29 Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública, 6 Assistentes Técnicos e 10 Assistentes Operacionais.

O SPC encontra-se centralizado em Tomar e recebe diariamente uma média de 300 doentes e 3700 provas analíticas (Gráfico 1).

Número de Amostras

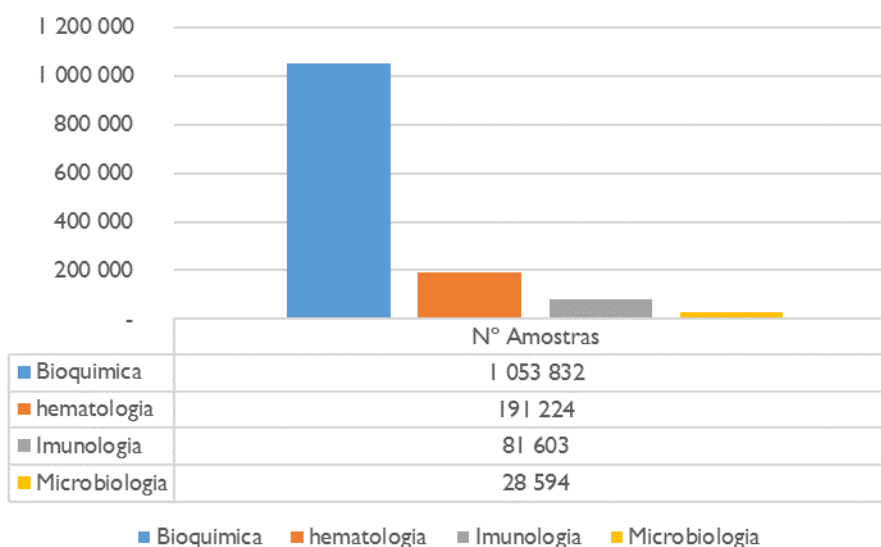


Gráfico I – Distribuição de análises realizadas por setor no ano de 2015.

O SPC aceitou o desafio de centralizar todos os setores analíticos na Unidade de Tomar, permanecendo dois Laboratórios de Urgência e apoio à rotina dos internamentos nas Unidades de Abrantes e Torres Novas. Em cada uma das Unidades, para além da realização de análises urgentes (para o Serviço de Urgência e Internamento) é disponibilizado, todos os dias úteis, aos utentes internos das consultas externas do Hospital e a qualquer utente externo, um horário de colheitas de amostras cuja receção e envio ao Laboratório Central é da responsabilidade do Laboratório de cada Unidade. Para o efeito, é utilizada a rede de transportes do CHMT.

O SPC assegura as análises do CHMT. Os parâmetros analíticos menos frequentes ou mais diferenciados são enviados para Laboratórios Externos. Para o efeito, as amostras são identificadas com nome, número de processo do utente e, acondicionadas em sistemas de transporte à prova de fuga, por forma a garantir a integridade das amostras.

No sentido de uma melhor prestação de cuidados de saúde à população da área abrangida pelo CHMT, o SPC identificou a necessidade de uma Consulta de Hipocoagulação Oral. Em cada uma das Unidades Hospitalares. O SPC é responsável pelo atendimento dos utentes desta consulta semanal.

O Laboratório Central do SPC encontra-se organizado em diferentes áreas de trabalho, tais como sala de espera, sala de colheitas, área administrativa, sala de lavagens, receção de

produtos, Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia. Existe ainda um gabinete de consulta, gabinetes de trabalho, armazéns e sala de arquivo.

No SPC do CHMT a Bioquímica e a Imunologia são dois setores que ocupam o mesmo espaço físico comportando-se estrutural e organizacionalmente como um grande setor.

De entre todos os outros, este é o setor de maiores dimensões e está dividido em vários espaços. Num deles, encontram-se os autoanalisadores de imunoquímica onde são estudados marcadores tumorais, hormonas e realizados testes de avaliação cardíaca e monitorização de fármacos, além da serologia infecciosa. Possui ainda espaços apropriados à execução de técnicas manuais, estudo eletroforético e imunofixação das proteínas.

Dentro do setor existe, ainda, um microscópio de fluorescência para estudos específicos de autoimunidade.

As análises efetuadas em cada setor analítico são validadas no próprio setor, por um Médico Patologista ou Técnico Superior de Saúde, que os pode disponibilizar ao clínico em suporte de papel e informaticamente.

O SPC está informatizado com um sistema de gestão laboratorial – ModuLab da Werfen, que permite garantir a rastreabilidade das amostras, desde o pedido efetuado pelo médico até à validação final de todos os parâmetros analíticos e saída do relatório individual do utente.

O Serviço encontra-se certificado pela Norma NP EN ISO 9001:2008 e a Política da Qualidade estabelece como princípios fundamentais a satisfação dos utentes e colaboradores, a qualidade e segurança dos cuidados prestados, a melhoria contínua do Sistema de Gestão da Qualidade e a formação contínua dos colaboradores. [1]

Para garantir a Qualidade no Laboratório, desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica, o SPC dispõe de várias ferramentas, tais como manuais de procedimentos, o Controlo de Qualidade Interno (CQI), o Programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), formação contínua do pessoal e cooperação interlaboratorial.

Devido à existência de quatro áreas tão distintas, o SPC recebe e processa uma grande diversidade de produtos. A amostra mais comum e que é utilizada na maioria dos setores é o sangue/ soro. A urina é a amostra mais frequente no setor de Microbiologia, embora seja utilizada para a determinação de metabolitos em outros setores. Com menor frequência aparecem amostras tecidulares, como gânglios e biópsias.

De forma a dar uma resposta rápida e eficiente a todos os doentes, o SPC possui vários equipamentos, que facilitam o trabalho dos técnicos e especialistas.

Na tabela I encontram-se listados os equipamentos utilizados nas diferentes áreas laboratoriais.

Tabela I – Equipamentos existentes no SPC do CHMT.

Setor	Equipamento	Fornecedor
Hematologia	Sysmex XE-2100	Emílio Azevedo Campos
	Sysmex XT-1800i	Emílio Azevedo Campos
	ACL Top 500	Werfen
	ACL Advance	Werfen
	Test ITHL	Emílio Azevedo Campos
	HA-8160	Menarini
Microbiologia	Microscan Walkaway 96	Beckman Coulter
	Vitek 2	Biomérieux
	Bactec 9120	Quilaban
	Bactec 9000	Quilaban
	GeneXpert	Werfen
Bioquímica	UniCel DxC 800	Beckman Coulter
	Access 2	Beckman Coulter
	GEM Premier 3000	Werfen
	Aution Max	Menarini
Imunologia	UniCel Dxl-800	Beckman Coulter
	Image 800	Beckman Coulter
	VIDAS	Biomérieux
	Mago Plus	Isoder
	Unicap 250	ThermoFisher
	Hydrasys Sebia	ThermoFisher

Fonte: SPC do CHMT

2.1 – Setor de Microbiologia

Neste setor faz-se a análise bacteriológica, micológica e parasitológica de diversos produtos biológicos, nomeadamente urinas, secreções respiratórias, exsudados (vaginais, uretrais, de lesões purulentas, nasais, auriculares, oculares, faríngeo, perineal, vaginal/ rectal, endocervical), sangue, fezes, Líquido Céfalorraquidiano (LCR), líquidos de serosas e outros produtos biológicos (biópsias cirúrgicas, gástricas, material de próteses e esperma). É um setor com muito trabalho manual, desde a sementeira dos diversos produtos, às colorações, e à observação ao microscópio.

O principal objetivo do trabalho efetuado no Setor de Microbiologia é a identificação dos microrganismos (Figura 1) responsáveis por um processo infeccioso e, sempre que necessário e possível, a obtenção do respetivo perfil de suscetibilidade aos antibióticos. Para que este objetivo seja atingido de forma correta e atempada é fundamental ter em conta um conjunto de aspetos, que vai desde a requisição, à colheita, acondicionamento, transporte e processamento da amostra.

Durante o estágio, para além da oportunidade de participar nas diversas atividades desenvolvidas no setor (receção das amostras, processamento, isolamento em meios de cultura, identificação dos agentes patogénicos e antibiogramas), ainda foi possível a participação no processamento de amostras para estudo micobacteriológico (pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilos ácido-álcool resistentes). [2]

No setor são utilizadas as colorações pelo método de Gram, Ziehl Neelsen modificado (método de Kinyoun) e fluorescência com auramina (Anexo I).

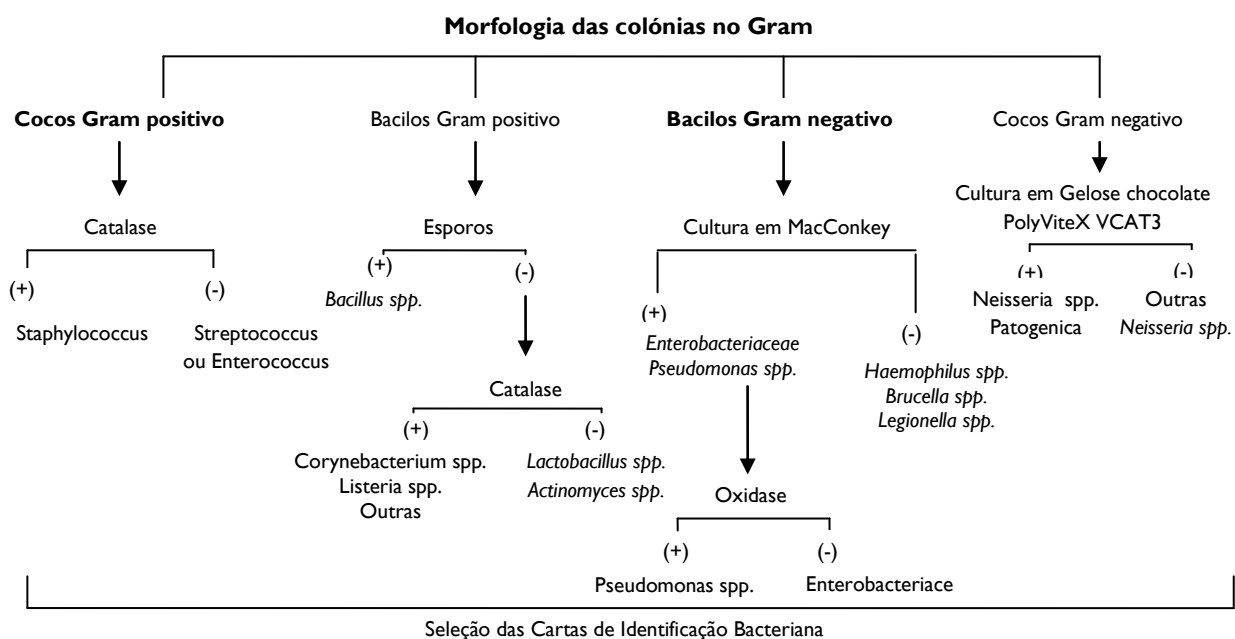


Figura 1 – Esquema representativo da Identificação Bacteriana.

Fonte: Adaptado de [3]

i) Urina

As infeções do aparelho urinário são as mais frequentes na população. A infeção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita, que invade o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. [2]

A mulher, devido a razões anatómicas e fisiológicas, tem uma maior predisposição para este tipo de infeções. [2]

Quando a infeção se localiza na bexiga é designada como cistite, por sua vez se atingir o trato urinário superior designa-se por pielonefrite. [2]

Os agentes etiológicos mais frequentes nas crianças e adultos, sem outras doenças associadas, são as Enterobacteriaceas com grande destaque para a *Escherichia coli*.

Em doentes internados e com fatores de risco como algaliação permanente, tubos de nefrostomia, cálculos urinários e outras patologias do aparelho urinário, o leque de agentes etiológicos alarga-se a outros microrganismos, como *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp.*, e leveduras, estas últimas particularmente em doentes que estão sob terapêutica antibiótica. [2]

A urina é habitualmente um líquido biológico estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir erros na interpretação da urocultura. Desta forma, a colheita da urina para a realização da urocultura deve obedecer a alguns princípios. Na maioria dos casos é o próprio doente que faz a colheita, pois deve ser o jato médio da primeira urina da manhã, colhida em condições de assepsia. [2]

Caso não seja possível, deve aguardar-se pelo menos 3 horas após a última micção antes de fazer a colheita. Para evitar a contaminação com a flora normal da vagina, perianal e uretral, é importante esclarecer o utente sobre o procedimento de colheita.

Para o diagnóstico de infeção do aparelho urinário são válidas ainda as seguintes amostras de urina:

- Punção de Cateter urinário, executada por pessoal especializado, em doentes algaliados, uma vez que não é indicada a colheita de urina do saco da algália; [2]
- Drenagem de nefrostomia/ ureterostomia;
- Saco coletor em crianças;
- Punção Supra - púbica, executada por pessoal especializado, é o método de eleição para colheita de urina não contaminada, em crianças ou em doentes cujos resultados de urina são de difícil interpretação.

Após a colheita, a urina deve ser transportada ao laboratório o mais rapidamente possível, uma vez que deverá ser semeada até uma hora após a colheita. Se não for possível, deverá ser refrigerada a 4° C e processada até às 24 horas após a colheita. [2]

Quando a refrigeração imediata não é possível, a urina deverá ser colhida para recipiente com conservante (Ácido bórico) e colocada à temperatura ambiente. Poderá ser processada até 24 horas após a colheita. Neste caso deve ter-se particular atenção ao volume da urina (10 mL) / preservante (possibilidade de falsos negativos quando o volume de urina é muito pequeno). [2]

A análise da urina divide-se em duas partes, a análise sumária ou urina tipo II, que permite avaliar a presença ou ausência de determinados parâmetros como proteínas, nitratos, glucose e determinar outros parâmetros como o pH e a densidade. Realiza-se recorrendo a tiras reagente Uriflet S, de plástico com áreas de reagentes e uma base de calibração. A base de calibração corrige automaticamente interferências de cor natural na urina, facilitando a medição dos vários constituintes. Esta função permite a sua utilização nos diagnósticos quotidianos. Para este exame químico, é utilizada urina não centrifugada, bem misturada e recém-produzida. O instrumento Aution max mede a tira automaticamente e imprime os resultados. A avaliação da cor e turvação da urina é efetuada também pelo equipamento.

Para além desta avaliação, é realizado o exame direto a fresco, ou seja, a observação ao microscópio do sedimento urinário, para averiguar a existência de leucócitos, células epiteliais, eritrócitos, cilindros e cristais, para pesquisa de elementos figurados. [2]

No SPC do CHMT este exame é realizado automaticamente no equipamento Sedimax, que efetua a centrifugação da urina.

A outra parte da análise da urina designa-se por urocultura e consiste na quantificação dos microrganismos presentes na urina. A urina é semeada em meio de cultura CLED (gelose diferencial para bactérias fermentadoras da lactose “Cystine Lactose Electrolyte Deficient”). No serviço de patologia clínica do CHMT, no caso das grávidas ou doentes com colheita por punção supra-púbica, a urina é ainda semeada em Gelose complementada com sangue de carneiro, adaptado à cultura da maior parte das espécies bacterianas (GS).

A inoculação do meio é feita segundo dois planos perpendiculares, utilizando uma ansa calibrada de 1 µl.

O meio CLED é incubado em aerobiose, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$; O meio GS em aerobiose, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 18 a 24 horas. [3]

É no meio CLED que se realiza a análise quantitativa. Normalmente, são consideradas positivas as amostras com uma quantidade de colónias superior a 10^5 UFC/mL (100 colónias

quando se utiliza uma ansa calibrada de 1 µl), como é o caso da figura 2. Amostras que contêm 3 ou mais colônias diferentes e/ ou têm uma contagem inferior a 10⁵ UFC/mL são consideradas polimicrobianas/contaminação. [2]

No entanto, é na interpretação dos resultados que surgem os maiores problemas, porque culturas de urina colhidas por técnicas “assépticas” podem estar contaminadas com flora normal, incluindo *Enterobacteriaceae*. Determinar o número de colônias que representa uma verdadeira infecção e não uma contaminação é muito importante e está relacionada com o quadro clínico do doente, informação que nem sempre chega ao laboratório. [3]

Dadas as dificuldades, os laboratórios tem os seus próprios critérios de diagnóstico e assim, todas as amostras colhidas por punção supra - púbica, cateter urinário ou outra intervenção cirúrgica, são sempre de valorizar, independentemente do número de colônias. As culturas que apresentem um número de colônias <10⁵ UFC/ mL são valorizadas ou não em função da informação clínica disponível. A presença de fungos ou leveduras, em qualquer número, é sempre reportada ao clínico e a sua identificação efetuada. [3]

O CLED é um meio sólido, seletivo, que permite diferenciar as bactérias que fermentam a lactose das que não fermentam (recorrendo ao indicador azul de bromotimol). As bactérias que fermentam a lactose produzem colônias de cor amarela, por acidificação do meio. As bactérias que não fermentam a lactose produzem colônias verdes, azuis ou incolores. A composição do meio (fraco conteúdo em eletrólitos) previne a invasão (“swarming”) por *Proteus sp.*. [2;3;4]



Figura 2. Cultura positiva de uma amostra de urina em meio CLED.

Fonte: SPC do CHMT

A GS é um meio não seletivo, em que a presença de sangue de carneiro permite a observação da presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise, critério básico para a orientação da identificação de algumas bactérias.

A sementeira neste meio é de particular importância no caso de mulheres grávidas, para averiguar a presença ou não de infecção por *Streptococcus agalactiae* do grupo B, cuja transmissão vertical está associada a várias complicações no recém-nascido. [3]

ii) Hemoculturas

Como o sangue é um produto biológico estéril, a presença de microrganismos é sempre de valorizar, ou seja, o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção. Daí a importância da sua detecção o mais rápido e rigorosamente possível.

O número e o intervalo entre as colheitas dependem da situação clínica, mas nunca efetuar apenas uma hemocultura por doente. A colheita destas amostras é efetuada, sempre que possível, antes do início da antibioterapia, de modo a não haver interferências, atraso ou inibição de crescimento) na recuperação dos microrganismos em cultura e utilizando técnicas estéreis, de forma a minimizar a possibilidade de contaminação, que pode resultar da introdução de microrganismos oriundos da pele do doente, mãos do técnico, equipamento contaminado ou durante o processo laboratorial. Desta forma, a desinfecção do local de punção, utilizando dois desinfetantes diferentes é conveniente. [2;5]

No mínimo, devem ser colhidas duas hemoculturas para frasco de aerobiose, em locais de punção venosa diferentes. Pese embora, se considere ser ideal, para o diagnóstico de qualquer bacteriemia, a colheita de pelo menos dois pares de hemoculturas (4 frascos), num período de 24 horas antes do início da terapêutica antibiótica, com um intervalo de 30 a 60 minutos (no sentido de detetar microrganismos nas bacteremias intermitentes) em locais de punção venosa diferentes para cada par. Duas destas hemoculturas poderão ser inoculadas em frascos de anaerobiose.

As amostras de sangue, colhidas com agulha e seringa, são inoculadas em frascos de cultura, que contém um meio líquido de soja – caseína digerida.

Todos os meios BACTEC são distribuídos com CO₂ adicionado. Os meios anaeróbios são previamente reduzidos e distribuídos com CO₂ e N₂. (Anexo II - Composição dos meios de cultura, BACTEC Plus Aeróbio/ F e Plus Anaeróbio/ F). [6]

Antes da inoculação da amostra, a tampa de borracha dos frascos é desinfetada com álcool a 70° (ou solução desinfetante equivalente, de acordo com política de desinfetantes do CHMT), tendo o cuidado de deixar evaporar todo o álcool antes de puncionar a borracha. O volume correto é condição imprescindível para a recuperação de microrganismos. Nas crianças, a concentração de microrganismos durante o período de bacteriemia é muito mais alta do que nos adultos, por isso são necessários menores volumes de sangue. Assim, os seguintes volumes devem ser respeitados:

Frasco para hemocultura (adultos) - 8 a 10 mL

Frasco para hemocultura pediátrico - 1 a 3 mL.

Para o caso particular das crianças está ainda recomendado que o volume colhido seja adaptado à idade e ao peso (Tabela II).

Tabela II – Volumes de sangue, para colheita de hemocultura, adaptados à idade e peso das crianças.

Peso	Vol. sanguíneo corporal estimado	Vol. sangue a colher (1ª colheita)	Vol. sangue a colher (2ª colheita)	Vol. total a colher	% Vol. sangue corporal a colher
≤1 Kg	50-99 mL	2 mL	-	2 mL	4%
1.1-2 Kg	100-200 mL	2 mL	2 mL	4 mL	4%
2.1-12.7 Kg	>200 mL	3 mL	3 mL	6 mL	3%
12.8-36.3 Kg	>800 mL	10 mL	10 mL	20 mL	2.5%
>36.3 Kg	>2200 mL	20-30 mL	20-30 mL	40-60 mL	1.8-2.7%

(adaptado de “A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)”, Clin Infect Dis. (2013) 57 (4): 485-488)

Os volumes colhidos têm em consideração a manutenção da proporção recomendada pelo fabricante em relação ao meio de cultura, que é 1:5. [2]

Após colheita, as hemoculturas devem ser enviadas de imediato ao SPC. Não sendo possível, para pesquisa de bactérias, conservar em estufa ($35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). [3]

Os frascos de cultura (Plus Aeróbio/ F e Plus Anaeróbio/ F) são colocados o mais rapidamente possível no equipamento da série fluorescente BACTEC para incubação e leituras periódicas. No SPC do CHMT o equipamento disponível é o BACTEC 9120.

Cada frasco contém um sensor químico que consegue detetar aumentos no CO_2 produzido pelo crescimento dos microrganismos, por fluorometria. O sensor é monitorizado a cada dez minutos, relativamente ao aumento da respetiva fluorescência, proporcional à quantidade de CO_2 presente, ou seja, se existirem microrganismos na amostra de teste inoculada dentro do frasco BACTEC, ocorrerá a produção de CO_2 , quando os organismos metabolizam os substratos presentes no frasco. A análise da velocidade e da quantificação do aumento de CO_2 permite ao equipamento determinar se a leitura do frasco é positiva, ou seja, se a amostra testada contém microrganismos viáveis. [3;5]

Não havendo crescimento bacteriológico, as amostras ficam no sistema automatizado durante 5 dias ou até 28 dias quando suspeita de diagnóstico de *Brucella spp.* Ao fim deste tempo é concluída a sua negatividade.

Quando as amostras são positivas realiza-se um exame direto e subculturas para um meio sólido a partir dos frascos de hemoculturas. No caso do exame direto, as amostras são coradas pela técnica de Gram e observadas ao microscópio. Para a realização da subcultura as amostras são semeadas em GS pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido, com incubação em aerobiose + CO_2 a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até às 48h (Figura 3). [2]

A gelose de sangue é um meio não seletivo, adaptado à cultura da maior parte dos microrganismos incluindo os fastidiosos. É suplementado com sangue de carneiro, que fornece

o fator X (Heme), permitindo a observação da presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise, critério básico para a orientação da identificação de algumas bactérias. [3]

No caso de suspeita de *Brucella sp.*, para além da GS, as amostras positivas são semeadas em gelose de chocolate enriquecida com Polyvitex (PVX), um meio não seletivo recomendado para o crescimento de microrganismos fastidiosos. É composto por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (hemina) e V (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina - NAD), fornecidos pela hemoglobina e polyvitex. [7,8]

As culturas são incubadas em aerobiose a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até às 48 horas.

Sempre que no exame direto corado pela técnica de Gram sejam observados cocobacilos Gram negativo é efetuada subcultura em meio de Haemophilus (HAE), incubado em aerobiose + CO_2 , a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

O HAE é um meio seletivo que se destina ao crescimento de microrganismos mais exigentes, é uma variante da gelose de sangue onde os eritrócitos se encontram lisados após aquecimento a 60°C . [7,8]

O fato de os eritrócitos estarem lisados permite o crescimento dos *Haemophilus*, pois estes microrganismos necessitam de dois fatores de crescimento, o Fator X (heme) e Fator V (NAD), fornecidos pela hemoglobina, presente no interior dos eritrócitos que, após lise, é libertada, podendo ser utilizados pelos microrganismos. A seletividade é obtida pela combinação de antibióticos. [7,8]

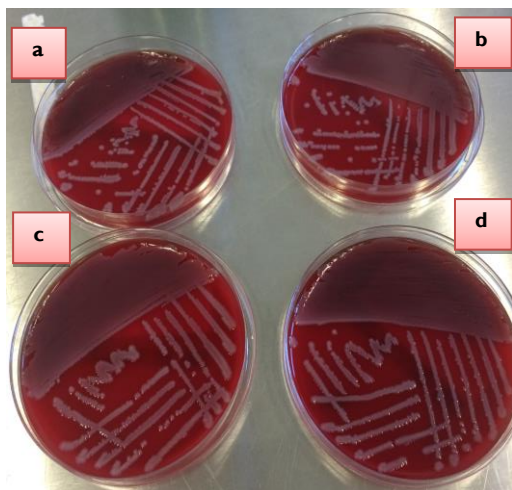


Figura 3 – Subcultura em GS de 2 pares de hemoculturas positivas para *Escherichia coli*, do mesmo doente, um par inoculado em meio de cultura que favorece o crescimento de microrganismos aeróbios e o outro em meio de cultura que favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios. Fonte: SPC do CHMT

- a. Hemocultura em aerobiose (Amostra 1)
- b. Hemocultura em aerobiose (Amostra 2)
- c. Hemocultura em Anaerobiose (Amostra 1)
- d. Hemocultura em anaerobiose (Amostra 2)

Quando o produto tem pedido de estudo micológico é acrescentado um meio seletivo para fungos, gelose de Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina (SAB), incubado em aerobiose, a 30°C . O SAB é um meio recomendado para o isolamento de fungos e leveduras a partir de amostras polimicrobianas. A acidificação do meio e o aumento do nível de peptonas e de dextrose favorecem o crescimento de fungos. A presença de gentamicina e cloranfenicol inibe o crescimento bacteriano.

iii) Ponta de cateter vascular

O processamento deste tipo de produtos tem como objetivo avaliar a possibilidade de responsabilidade do cateter como origem de um quadro de bacteriemia. Para efeito de padronização e valorização das culturas, devem ser colhidos assepticamente 5 cm da porção terminal do cateter, colocados em recipiente estéril e seco, enviado imediatamente ao laboratório.

A sementeira é feita em GS pelo Método de Maki (Figura 4), que consiste em, com o auxílio de uma pinça estéril, colocar a ponta do cateter na superfície do meio de cultura, fazendo o rolar por toda a superfície do meio, para frente e para trás, pelo menos duas vezes. Para a obtenção de colônias isoladas, é muito importante que a ponta do cateter role sobre o meio e não seja esfregado. São consideradas positivas, as culturas que, após 24h de incubação em atmosfera de aerobiose + 5% CO₂, a 35° ± 2°C, apresentem desenvolvimento superior a 15 colônias. [2]

Na interpretação dos resultados deve realizar-se a identificação e estudar a suscetibilidade aos antimicrobianos em estirpes isoladas com grande probabilidade de serem agentes patogênicos, independentemente do número: *Streptococcus* beta-hemolítico do Grupo A de Lancefield, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*; Agentes potencialmente patogênicos com suscetibilidade imprevisível aos antimicrobianos; Microrganismos isolados de doentes com infecções associadas a cateteres e de locais normalmente estéreis. [2]

São considerados agentes provavelmente “contaminantes” da pele: (geralmente não responsáveis por infecção) *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus viridans*, *Bacillus spp.*, difteroides, com exceção de microrganismos isolados em cultura pura e observados no exame direto corado pela técnica de Gram. [2]

Quando estão presentes mais do que duas/ três espécies microbianas (particularmente da flora da pele) não devem ser valorizados laboratorialmente. [2]

Correlacionar os isolamentos da cultura do cateter, com o resultado da hemocultura concomitante. [2] Não são recebidos cateteres para estudo sem hemocultura a acompanhar.

Na figura 4 está representada uma cultura positiva de uma ponta de cateter, em GS, pelo Método de Maki.



Figura 4 – (a.) cultura positiva de ponta de cateter, semeada em GS pelo Método de Maki (b.) para *Escherichia coli*.

Fonte: SPC do CHMT

iv) Fezes

O trato gastrointestinal, principalmente o intestino e o cólon são zonas ricas em flora microbiana. Apesar da existência de barreiras naturais do organismo contra os microrganismos invasores, as perturbações gastrointestinais têm uma elevada incidência na população em geral, com grande morbidade em determinados grupos etários (crianças e idosos).

Frequentemente os médicos generalistas deparam-se com casos de diarreia aguda, no entanto, os microrganismos responsáveis por esta infeção têm vindo a alterar-se, devido a vários fatores tais como a maior frequência de viagens intercontinentais, aumento do número de doentes imunodeprimidos e o desenvolvimento de métodos de diagnóstico cada vez mais sensíveis.

Os antecedentes epidemiológicos, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos e o tipo de diarreia devem orientar na pesquisa do agente etiológico.

A amostra deve ser colhida para um recipiente estéril e devem ser processadas até 2 horas após a sua emissão, sem sofrer refrigeração. Em situações em que não exista essa possibilidade, as fezes são colocadas em meio de transporte de Cary Blair.

Devem ser obtidas até um total de três amostras colhidas em dias consecutivos, porque a emissão dos microrganismos não é contínua. [2;3]

Por rotina, no SPC do CHMT, realiza-se a pesquisa das Enterobacteriaceas, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Yersinia enterocolitica*. É ainda efetuada a pesquisa de *Campylobacter spp.*, da família *Neisseriaceae*. Dentro do género, as espécies mais frequentemente isoladas e associadas a gastroenterites humanas são *C. jejuni* e *C. coli*. [3]

Caso haja necessidade de pesquisar outros microrganismos o laboratório deve ser informado. As amostras são semeadas em meio de MacConkey (MAC), Hektoen (HEK), Yersinia (YER) e em caldo de selenito, incubados em aerobiose, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 horas. Para a pesquisa de *Campylobacter spp.* faz-se a sementeira em gelose Campyloset (CAMPY), incubada a $42^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, durante 72 horas, em microaerofilia (5% de O_2 , 10% de CO_2 , e 85% de N_2).

O MAC é um meio seletivo e diferencial. Este meio é seletivo para bactérias Gram negativo. A seletividade é fornecida pelos sais biliares e cristal violeta.

É também um meio diferencial para bactérias fermentadoras da lactose, que permite detetar a sua fermentação através da mudança de cor para vermelho. As bactérias que fermentam a lactose formam colónias de cor rosa a vermelho. As bactérias que não fermentam a lactose formam colónias incolores ou de cor bege. [7]

O HEK é considerado um meio seletivo e diferencial, recomendado para o isolamento de espécies de *Salmonella* e *Shigella*. [7]

Este meio é constituído por sais biliares e corantes que inibem o crescimento de bactérias Gram positivo. Contêm ainda três hidratos de carbono, lactose, sacarose e salicina que não são utilizados pela *Shigella spp.* nem pela *Salmonella spp.*, permitindo dessa forma a diferenciação destes microrganismos, relativamente a outros que os utilizam, como a *Escherichia coli*. A fucsina ácida e o azul de bromotimol funcionam como indicadores de pH, sendo que na presença de microrganismos fermentadores o meio muda de cor para salmão/amarelo. No caso dos microrganismos não fermentadores, como é o caso das bactérias que pesquisamos neste exame, mantém-se inalterado, colónias verdes ou verdes azuladas (Figura 5). [7]

Este meio possui ainda tiosulfato de sódio e citrato de amónio férrico, que permitem a produção de H₂S por parte de algumas espécies de *Salmonella spp.*, surgindo assim as colónias com um centro negro, o que permite a distinção com a *Shigella spp.*. [3]

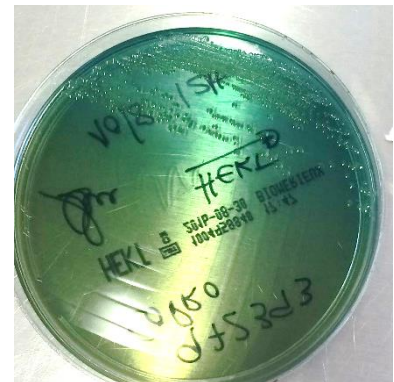


Figura 5 – Meio HEK inoculado com amostra de fezes positiva para *Shigella spp.*
Fonte: SPC do CHMT

O meio YER CIN (Cefsulodina, Irgasan e Novobiocina) é um meio de isolamento seletivo para deteção e diferenciação de espécies de *Yersinia* em amostras de fezes (Figura 6).

O vermelho neutro presente no meio permite diferenciar

Yersinia pela cor das colónias (rosa escuro a colónias vermelhas). A presença de colato, desoxicolato e cristal de violeta, inibem o Irgasan e antibióticos de bactérias gram-negativas e gram-positivas. [7]

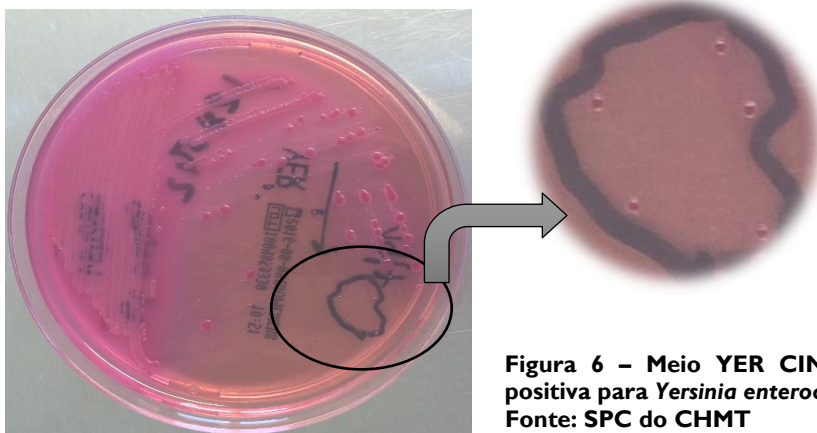


Figura 6 – Meio YER CIN inoculado com amostra de fezes positiva para *Yersinia enterocolitica*.
Fonte: SPC do CHMT

O Caldo de Selenito, meio líquido e seletivo, utilizado para enriquecimento e isolamento de espécies de *Salmonella* e *Shigella*. O selenito inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*. [2;3]

Normalmente, é recomendado que, após 6 a 12 horas de incubação, sejam efetuadas subculturas para meio de MAC e outros meios seletivos, a partir do meio de enriquecimento, porque este é o tempo médio de inibição do crescimento de outros microrganismos, como *Proteus spp.* [2]

O meio CAMPY é um meio seletivo para *Campylobacter spp.*, que inibe a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos, devido à presença de antibióticos e antifúngicos no meio. As colônias características de

Campylobacter são pequenas e aczentadas (Figura 7). A amostra deve ser incubada a $42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 72 horas, em microaerofilia (5% de O_2 , 10% de CO_2 , e 85% de N_2). [7]

No entanto, deve proceder-se à realização do exame direto corado pela técnica de Gram (Figura 8), para verificar a morfologia (em forma de “Asa de Gaivota”). Para observar a mobilidade (exame entre lâmina e lamela), às 24 horas e às 48 horas. [3]

O teste da catalase e da oxidase permitem a identificação presuntiva de *Campylobacter spp.*, ambos positivos. [3]



Figura 7 – Cultura em meio CAMPY de uma amostra de fezes, positiva para *Campylobacter jejuni* às 48h. Fonte: SPC do CHMT.

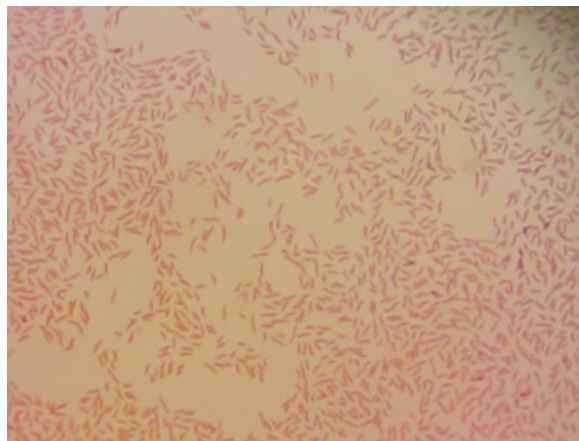


Figura 8 – Gram de colônia de uma cultura em meio CAMPY de uma amostra de fezes, sugestivo de *Campylobacter spp.*. Fonte: SPC do CHMT

O *Clostridium difficile* é uma bactéria responsável por colites pseudomembranosas e diarreias graves devido à associação de antibióticos, que diminuem a flora comensal permitindo a proliferação deste microrganismo. O *Clostridium difficile* produz duas toxinas: a toxina A, uma enterotoxina, e a toxina B, uma citotoxina. Estas toxinas são responsáveis por causar danos no hospedeiro.

Tal como já foi referido, as amostras de fezes devem ser processadas o mais precocemente possível. No caso particular do *Clostridium difficile* se, por algum motivo, houver atraso no processamento, a conservação previsível é a indicada na tabela III:

Tabela III – Conservação de amostras.

Temp. Ambiente	2 Horas
Refrigerada	72 Horas
Congelada	1 Semana

Fonte: ARUL Laboratories (<http://www.aruplab.com>)

No setor de Microbiologia do SPC do CHMT a pesquisa de *Clostridium difficile* só é efetuada em amostras diarreicas e em situações pedidas por parte do especialista, conforme Norma DGS 019/2014, de 19/12/2014, com atualização em 24/03/2015 (Anexo III). É utilizado o teste H&R *C. difficile* GDH. Teste rápido, imunocromatográfico, que permite a deteção qualitativa da glutamato desidrogenase (GDH) de *Clostridium difficile*. Se o resultado é negativo, a pesquisa está concluída. Se o resultado é positivo (Figura 9), ou seja, se o *Clostridium* estiver presente, faz-se a pesquisa da toxina A/B, utilizando o teste H & R *Clostridium difficile* Toxin A-B, um teste rápido, imunocromatográfico, para a deteção qualitativa do antígeno da toxina A e B, em amostras de fezes.

Clostridium difficile pode estar presente sem haver infeção, a produção de toxinas é que é patogénico. [9]

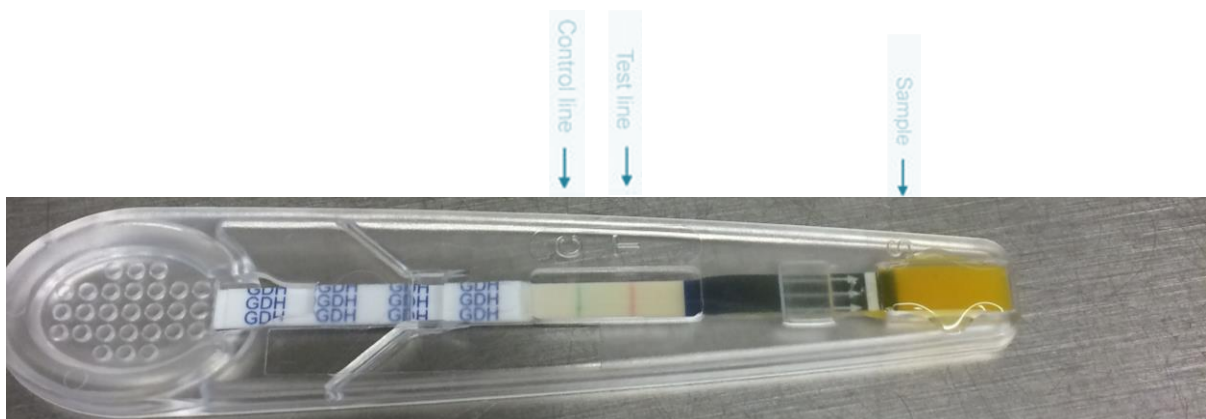


Figura 9. Representação de um resultado positivo do teste de pesquisa de GDH de *Clostridium difficile* utilizando o teste H&R *Clostridium difficile* GDH.

Fonte: SPC do CHMT

Em casos de suspeita clínica de parasitose intestinal, o exame parasitológico é fundamental, como forma de proceder à identificação correta de ovos, quistos e parasitas.

Nestes casos, também porque a emissão não é contínua, devem ser obtidas três amostras, colhidas em dias alternados, para frascos secos, limpos e resistentes. As amostras não devem ser misturadas nem estar contaminadas com urina. Realiza-se uma análise macroscópica, para avaliar a consistência, a cor, a presença de muco ou sangue e a presença de parasitas.

É ainda realizado um exame microscópico, utilizando o dispositivo IBERKIT Easy-Copros, que tem por base o método de sedimentação por centrifugação de Ritchie, simplificado, com a finalidade de concentrar num pequeno volume, ovos, quistos e larvas de parasitas, provenientes de amostras fecais para posterior identificação. [5]

Para a pesquisa de *Enterobius vermicularis* (Oxiuros), parasitose intestinal mais frequente na criança em idade escolar, a técnica da fita adesiva é a mais indicada, porque raramente os ovos são encontrados nas fezes. A colheita deve ser efetuada de manhã ao acordar, antes do banho ou defecção, e consiste em aplicar fita adesiva na região perianal, removê-la e colá-la numa lâmina para visualização microscópica - Teste de Graham. Os adultos vêm-se macroscopicamente. [10]

A enterobiose ou oxiúriase é adquirida pela ingestão de ovos embrionados, as larvas eclodem no intestino delgado e os adultos estabelecem-se no cólon. O acoplamento tem lugar na porção terminal do íleon. As fêmeas adultas contendo no seu interior os ovos “fêmeas grávidas” (Figura 10) migram durante a noite e depositam os ovos na região perianal, causando prurido intenso. [10]

O diagnóstico é efetuado quando se detetam vermes adultos (de cor branca, a Fêmea com 1 cm e o macho com 0,5 cm de comprimento) e/ ou ovos (Figura 10). [10]

Embora a principal via de transmissão seja a mão - boca (autoinfecção), o diagnóstico

laboratorial e posterior tratamento é muito importante, porque,

transmissão pessoa – pessoa pode ocorrer, dada a natureza dos ovos, muito pequenos (50-60µm), facilmente podem ser inalados por manipulação de roupas ou objetos contaminados (roupa de cama, banho, brinquedos), transformando-se em epidemias familiares. [10]



Figura 10 – Observação microscópica de Adulto fêmea de *Enterobius vermicularis* com ovos em amostra de fezes de uma criança.
Fonte: SPC do CHMT

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é fundamental, no rastreio ou suspeita clínica de patologias gastrointestinais inferiores, tais como cancro colon-retal, pólipos e grandes adenomas que sangram. Esta análise no SPC do CHMT é efetuada recorrendo ao *Chemtrue*[®] teste One-Step FOB, um teste rápido, imunocromatográfico, para deteção qualitativa de hemoglobina de sangue humano nas amostras fecais, através da interpretação visual do desenvolvimento de cor no dispositivo de teste. [11]

O dispositivo para a realização do teste contém uma tira que se encontra revestida com um anticorpo anti hemoglobina humana na região T (teste) e um anticorpo de cabra anti rato na região C (controlo). A amostra de fezes, dissolvida em tampão salino, é colocada num poço que contém um anticorpo anti hemoglobina humana conjugado de ouro coloidal, localizado no fim da membrana. Quando a hemoglobina humana está presente na amostra de fezes, a mistura de conjugado e da amostra extraída ascende ao longo da membrana cromatográfica por capilaridade. Os testes são considerados positivos, quando aparece uma banda colorida na região T. O bom desempenho do teste é indicado pelo aparecimento de uma banda colorida na região C. [11]

Na figura 11 estão representados os vários resultados que podemos obter neste teste. [11]

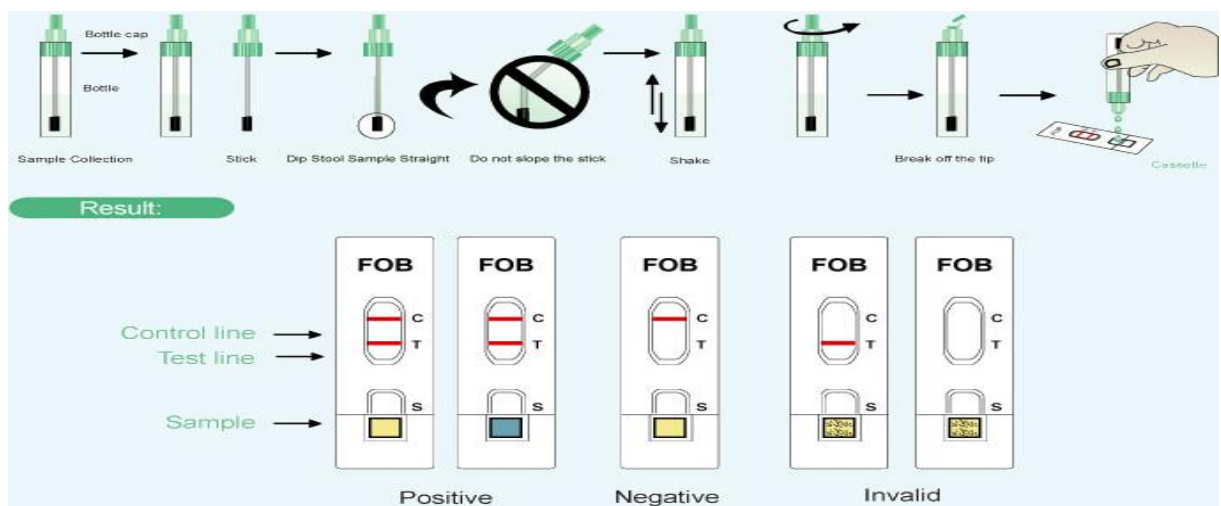


Figura 11 – Representação dos possíveis resultados do teste de pesquisa de sangue oculto utilizando o *Chemtrue*[®] teste One-Step FOB.

(Fonte:<http://www.interchemical.com/products.asp?ID=39>)

A identificação morfológica e bioquímica de algumas espécies é apoiada por técnicas serológicas.

E. coli O157 Test: consiste num teste de aglutinação em latex para a identificação do serogrupo *E. coli* O157.

Algumas estirpes de *Escherichia coli* têm sido relacionadas com casos de colite hemorrágica (CH) e de síndrome urémica hemolítica (SUH). Tem sido mostrado que estas estirpes produzem uma verocitotoxina (VT). O serotipo de *Escherichia coli* mais frequentemente isolado nos casos de CH e SUH é o O157:H7. O isolamento deste serotipo em fezes diarreicas, particularmente quando se observa a presença de sangue é indicativo de uma estirpe produtora de VT.

O teste em latex Oxoid *Escherichia coli* O157 demonstrará por aglutinação em lâmina, estirpes de *E. coli* que possuem o antígeno do serogrupo O157.

Caso haja aglutinação no espaço de um minuto o teste é considerado positivo. [12]

BD Difco: *Salmonella* antisoro O, *Salmonella* antisoro H e *Salmonella* antisoro Vi, são antisoros de coelho policlonais liofilizados, que se utilizam nos testes de aglutinação para a identificação de *Salmonella* mediante antígenos somáticos (O), flagelares (H) e Vi, respetivamente. [6]

A espécie *Salmonella* é responsável por uma diversidade de doenças humanas, que podem variar de uma simples gastroenterite, com remissão espontânea, até formas mais graves, com bacteriemia ou febre tifoide, podendo colocar em risco a vida do doente. A doença grave e a bacteriemia estão normalmente associadas com três serotipos de *Salmonella entérica* subespécie *entérica* (*choleraesuis*, *paratyphi A* e *typhi*).

Os antígenos somáticos O são termoestáveis e identificam-se primeiro. O antígeno Vi é termolábil e pode rodear a parede celular, comprometendo a atividade do antígeno somático. Os microrganismos com o antígeno Vi não aglutinam no antisoro O. Os Antígenos flagelares H são termolábeis e estão normalmente associados à mobilidade.

A identificação da espécie *Salmonella* inclui testes bioquímicos e serológicos. O teste serológico consiste numa reação de aglutinação antígeno – anticorpo. Uma reação positiva é rápida, de alta afinidade (a região variável do anticorpo interage com o antígeno em vários locais) e alta avidéz (elevada especificidade do anticorpo), que se traduz na formação de um complexo antígeno-anticorpo estável e forte.

Caso haja aglutinação o teste é considerado positivo. Um teste positivo deve apoiar a identificação morfológica e bioquímica do microrganismo.

v) Aparelho Respiratório Superior

As infeções das vias respiratórias superiores são muito frequentes, sendo a maior parte de origem viral. Apesar destas infeções ocorrerem sobretudo em picos sazonais, todo o ano chegam ao laboratório amostras para o diagnóstico bacteriológico, uma tentativa de identificar, entre uma flora indígena abundante, o (s) agente (s) implicado (s). [2]

No aparelho respiratório superior existe uma flora mista abundante, constituída por aeróbios e anaeróbios. Vários agentes patogénicos tais como o *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, leveduras e membros das *Enterobacteriaceae*, podem constituir uma flora transitória ou estar presente em pequeno número na orofaringe de indivíduos saudáveis. Nos seios paranasais e ouvido médio, em indivíduos saudáveis, não há flora microbiana. [2]

Na tabela IV estão representadas as principais infeções bacterianas do Aparelho Respiratório Superior e respetivo agente patogénico. [2]

Tabela IV – Principais infeções bacterianas do Aparelho Respiratório Superior e respetivo Agente patogénico.
[2]

Síndrome Clínica	Agente Patogénico
Faringite Estreptocócica	<i>Streptococcus pyogenes</i> (<i>Streptococcus</i> β -hemolítico do grupo A)
Faringite Gonocócica	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
Faringite na Tosse Convulsa	<i>Bordetella pertussis</i>
Faringite Diftérica	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Epiglotite	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B
Sinusite*	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacilos Gram negativo</i>
Otite Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i>

*Frequentemente de origem endógena, a partir de microrganismos presentes nas vias aéreas superiores.

A colheita é realizada por especialista e a única amostra válida para exame bacteriológico é obtida por punção do seio perinasal.

A colheita de amostras das vias respiratórias superiores, com fins epidemiológicos, ocorre na maioria das vezes com o objetivo de se fazer a deteção de portadores de *Staphylococcus aureus* e de *Neisseria meningitidis*. [2]

O despiste de portadores de *N. meningitidis* assume particular importância no controlo de disseminação da infeção a partir de um caso de doença meningocócica. [2]

No SPC do CHMT nos exsudados nasais e perineais, por rotina, apenas se pesquisa, para fins epidemiológicos e de contenção no meio hospitalar, a presença de *Staphylococcus aureus* metilina resistente, com vista a auxiliar na prevenção e controlo de infeções em instalações de cuidados de saúde, de acordo com a Norma DGS 018-2014 (Anexo IV). Para o efeito, o produto é semeado em meio cromogéneo *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), incubado em aerobiose, a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 18 horas.

A gelose chromID MRSA SMART é um meio de cultura cromogéneo destinado ao rastreio de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) nos pacientes portadores ou pacientes de risco. Os MRSA são bactérias multirresistentes que podem ser responsáveis por infeções nosocomiais.

A gelose chromID MRSA SMART é constituída por uma base rica que associa diferentes peptonas, substratos cromogéneos e uma mistura de antibióticos que permitem a deteção direta de estirpes de MRSA pela revelação da atividade enzimática. Estas estirpes produzem uma α – Glucosidase e formam colónias rosa a vermelho (Figura 12). [7]

A mistura seletiva de antibióticos permite inibir a maioria das bactérias Gram negativo e Gram positivo (não pertencentes ao género *Staphylococcus*, bem como leveduras e fungos.

Neste contexto, a utilização da gelose chromID MRSA SMART no rastreio contribui para a vigilância ativa de MRSA.

[7]

Nos exsudados faríngeos, por rotina, apenas se pesquisa a presença de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) (exame cultural ou, se pedida,

pesquisa de antigénio), principal causa de faringite bacteriana. Outras causas de faringite são a *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*, devendo a pesquisa destes agentes ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do Médico. [2]

As amostras são semeadas em GS, incubada em aerobiose + CO_2 a $35^{\circ} \pm 2\text{C}$ durante 24 horas, e em caldo de enriquecimento “Brain Heart Infusion” (BHI), incubado em aerobiose a $35^{\circ} \pm 2\text{C}$. O BHI é um meio líquido, não seletivo, com coração e cérebro. [2]

No SPC do CHMT não se realiza a pesquisa de microrganismos anaeróbios, em caso de suspeita as amostras são enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

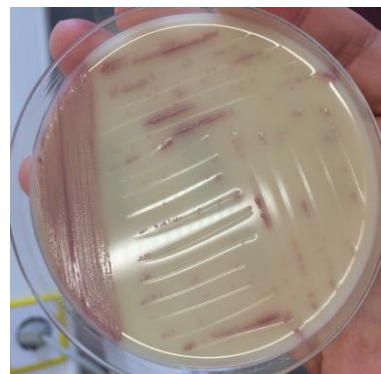


Figura 12 – Meio de cultura ChromID MRSA SMART inoculado com um exsudado nasal, positivo para *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

Fonte: SPC do CHMT

vi) Aparelho Respiratório Inferior

O sistema respiratório apresenta variados mecanismos de defesa contra as infecções: tosse, cílios nasais, humidificação das fossas nasais, flora normal da nasofaringe e orofaringe, tapete mucociliar dos seios nasal, ouvido médio e da árvore traqueobronquial, secreção de fatores antimicrobianos (Imunoglobulina humana A - IgA, Lisozima e Lactoferrina), Macrófagos, Leucócitos e Monócitos. [3]

Para o estudo de infecções do trato respiratório inferior há uma grande variabilidade de amostras:

- Expetoração;
- Aspirados brônquicos;
- Lavado/Escovado brônquico.

A amostra de expetoração é a mais frequente. A colheita deve ser realizada logo pela manhã, pois durante a noite as secreções acumulam-se nas vias respiratórias obtendo-se uma amostra mais rica. Também devem ser colhidas três amostras em dias consecutivos, pois a emissão de alguns microrganismos não é contínua.

As amostras são observadas ao microscópio após coloração de Gram, sendo que a qualidade da mesma é definida pela presença de leucócitos e células epiteliais. Na observação através da ampliação de 10x, seguindo as diretrizes das Tabela de Murray e Washington (Anexo V), amostras contendo pelo menos 25 leucócitos e no máximo 10 células epiteliais devem ser aceites para a análise e observadas na ampliação de 100x de imersão, como é o caso da amostra apresentada na figura 13.

Por outro lado, amostras que contêm mais de 25 células epiteliais por campo devem ser rejeitadas, como é o caso da amostra apresentada na figura 14. [2]



Figura 13 - Esfregaço de uma expetoração, corada por Gram, de boa qualidade: elevado número de Leucócitos e flora Bacteriana abundante (Cocos Gram positivo).
Fonte: SPC do CHMT

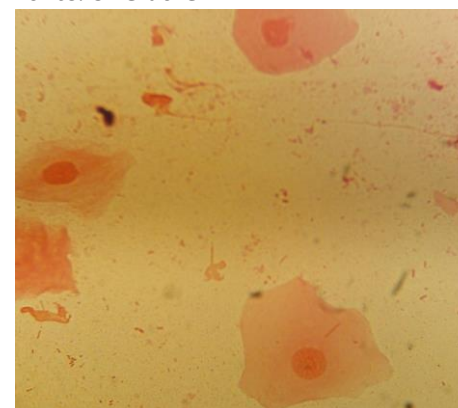


Figura 14 - Esfregaço de uma expetoração, corada por Gram, de má qualidade: elevado número de Células epiteliais.
Fonte: SPC do CHMT

Estas amostras são semeadas pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido em dois meios de cultura: GS e HAE.

Os microrganismos do género *Haemophilus* (bacilos/ cocobacilos Gram negativo) fazem parte da flora normal do trato respiratório superior e as espécies mais frequentemente isoladas e patogénicas para o homem são o *H. influenzae*. [3]

Quando o produto tem pedido de estudo micológico é acrescentado um meio seletivo para fungos, SAB, incubado em aerobiose, a 30°C, durante 24 horas.

vii) Exsudados oculares, auriculares e de feridas

Nos exsudados oculares, devido à constante ação de lavagem das lágrimas, o número de bactérias isoladas é normalmente baixo, pelo que, por rotina, faz-se a sementeira em BHI, GS e HAE. A sementeira no meio de HAE prende-se com o facto de frequentemente a espécie *Haemophilus aegyptus* estar associada a conjuntivites em crianças. [3]

Quando o produto tem pedido de estudo micológico é acrescentado um meio seletivo para fungos, SAB.

Os exsudados auriculares são processados da mesma forma que os exsudados oculares.

Os exsudados purulentos que provêm de feridas, abscessos, fistulas (etc.), colhidos com zaragatoa, previamente colocada em 0,5 ml de meio BHI, são semeados em GS, MAC e BHI.

É realizado apenas o exame direto com coloração de Gram. [2]

Quando o produto tem pedido de estudo micológico é acrescentado um meio seletivo para fungos, SAB.

A GS e o HAE são incubados em aerobiose + CO₂, a 35° ± 2°C. O MAC e o BHI são incubados em aerobiose, a 35° ± 2°C. O SAB é incubado em aerobiose a 30°. Todos durante 24 horas.

viii) Aparelho Genital

Os exsudados vaginais são colhidos com zaragatoa que deve ser transportada em meio de *Stuart* modificado. [3]

A amostra é semeada em GS e gelose seletiva para bactérias do género *Neisseria* (VCAT), incubados em aerobiose + CO₂, a 35° ± 2°C. Na rotina do SPC do CHMT, estas amostras são sempre semeadas em meio Cândia (CAN), gelose cromogénea para identificação de *Candida spp.*, incubado em aerobiose, a 30°C. [2]

Candida spp. é responsável pela maioria das infeções fúngicas oportunistas. As infeções por *Candida spp.* são causadas por uma variedade de espécies, mas a *Candida albicans* é o agente etiológico mais frequente, seguido da *Candida tropicalis*. Estes microrganismos fazem parte da flora normal da vagina e acredita-se que muitas das infeções tem origem endógena. [3]

O VCAT, gelose de chocolate + polyViteX VCAT3, descrita por Thayer e Martin, é um meio seletivo para o isolamento das espécies patogénicas para o homem da família *Neisseriaceae* (*Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*) em colheitas polimicrobianas.

Esta gelose é composta por uma base nutritiva enriquecida com fatores X (Hemina) e V (NAD) produzidos pela hemoglobina e o PolyViteX. A seletividade é obtida por uma associação de antibióticos e antifúngicos (Vancomicina, Colistinaina, trimetoprim, nistatina, Anfotericina B ou anisomicina) que permitem inibir a maioria das outras bactérias e leveduras que não as espécies pesquisadas. [7]

As bactérias da espécie *Neisseria gonorrhoeae*, quando observadas no esfregaço corado pelo Gram, aparecem normalmente em forma de diplococos, Gram negativo, intracelulares, com morfologia característica em “grão de café” ou “rim”. Estas bactérias são o agente etiológico da gonorreia, uma doença sexualmente transmissível (DST). [3]

A deteção de *Neisseria gonorrhoeae* é particularmente importante na vigilância e controlo das DST, tendo em conta que, dados recentes do programa Europeu de vigilância antimicrobiana gonocócica mostram um aumento da resistência aos antibióticos comuns para o tratamento, o que é indicativo de que a gonorreia pode tornar-se uma doença incurável no futuro próximo. [13]

O CAN é um meio cromogéneo para isolamento seletivo de fungos leveduriformes, identificação de espécies de *Candida albicans* e diferenciação presuntiva de um conjunto de espécies (*C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. kefyr*). A hidrólise de um substrato cromogéneo de hexosaminidase leva à coloração azul das colónias de *C. albicans*. A hidrólise de um eventual segundo substrato permite diferenciar culturas mistas e orientar a identificação para outras espécies. As colónias que hidrolisam este substrato são pigmentadas de rosa (Figura 15). [7]

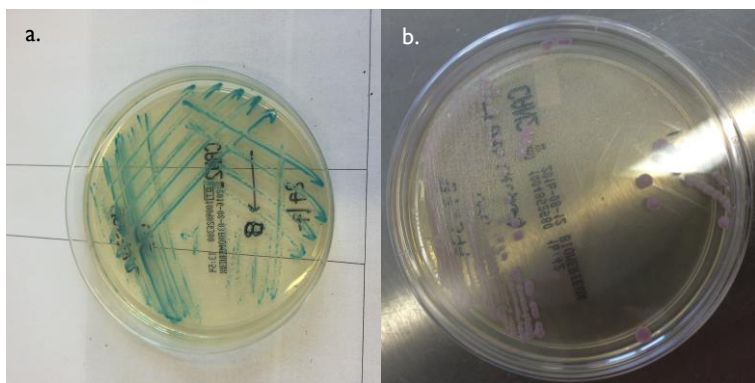


Figura 15 – Meio de cultura CAN inoculado com uma amostra de exsudado vaginal, positiva para *Cândida albicans* (a.) *Cândida tropicalis* (b.).
Fonte: SPC do CHMT

O processamento deste tipo de amostras inclui um exame direto a fresco com observação entre lâmina e lamela, utilizando a ampliação de 40x e um exame direto após coloração de Gram utilizando a ampliação de 100x. O objetivo do exame a fresco é a observação de leucócitos, flora (no caso da *Trichomonas vaginalis* é possível verificar o movimento da mesma devido ao facto de possuir flagelos). Na coloração de Gram, podemos observar leucócitos, flora microbiana existente e *clue cells*, células epiteliais cobertas de bactérias que são comuns em infeções por *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus spp.* [3]

No exsudado vaginal/ rectal, por rotina, apenas se pesquisa a presença de *Streptococcus agalactiae* Grupo B, que colonizam a vagina e região perianal e cuja transmissão vertical está associada a graves complicações no recém-nascido, dando cumprimento à Norma DGS 037-2011 (Anexo VI).

As amostras são semeadas em meio cromogéneo para identificação presuntiva de *Streptococcus agalactiae* Grupo B (STRB), incubado em aerobiose, a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. O STRB tem três substratos cromogéneos para permitir o isolamento e identificação, com formação de colónias cor-de-rosa claro a vermelho, redondas e em forma



Figura 16 – Meio de cultura Chrom ID STRB inoculado com uma amostra de exsudado vaginal rectal, positiva para *Streptococcus agalactiae* Grupo B.
Fonte: SPC do CHMT

de pérola (Figura 16), após 18 – 24 h de incubação, em aerobiose, a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. [7]

ix) Outros líquidos biológicos

O LCR é considerado uma emergência médica, pois a infecção das meninges é uma situação clínica grave e potencialmente mortal, por isso requer processamento imediato.

O LCR deve ser colhido antes do início da terapia antimicrobiana, por punção lombar, em tubos inquebráveis, transparentes, com uma tampa de rosca e fundo cônico, para concentração do produto, uma vez que pode conter muito poucas bactérias. Deve ser enviado ao laboratório imediatamente após a colheita sem refrigeração, ou seja, mantido à temperatura ambiente ou em estufa a 35°C. Apenas o LCR para estudos virais deve ser refrigerado ou congelado.

São necessários 3 tubos: 2 para exame citológico e bioquímico e outro para exame microbiológico (último tubo).

O volume de amostra de LCR e a sua aparência microscópica devem ser sempre avaliados.

Se o volume de LCR for superior a 1 ml centrifugar durante 10 minutos a 1500 – 3000 g. Se for inferior, utilizar apenas o agitador para homogeneizar a amostra.

Os sedimentos das respectivas amostras devem ser semeados, com pipeta esterilizada, em GS e PVX, incubados em aerobiose + CO₂, a 35° ± 2°C, durante 24 horas. Também é sempre semeado em meio líquido BHI, incubado em aerobiose, a 35° ± 2°C.

Quando o produto tem pedido de estudo micológico é acrescentado um meio seletivo para fungos, SAB, incubado em aerobiose, a 30°C.

Além do exame cultural, faz-se também o exame citológico, com contagem de leucócitos e diferencial.

Devido ao fato de ser um líquido estéril, qualquer microrganismo observado é valorizado e imediatamente comunicado ao clínico. [2;3]

Além do LCR, o SPC do CHMT recebe e processa outros líquidos (pleural, pericárdico, sinovial, peritoneal e ascítico).

Devido ao fato de serem líquidos normalmente estéreis, qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado. [2;3]

No SPC são ainda utilizados outros meios de cultura: Manitol Salgado (MSA), meio que se destina ao isolamento seletivo de bactérias do género *Staphylococcus*.

Os microrganismos que fermentam o manitol dão colónias amarelas, um critério de orientação para a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus* (Figura 17).

A elevada concentração de NaCl (7,5%) inibe a maior parte dos Gram negativo permitindo o isolamento de *Staphylococcus spp.*. [7]

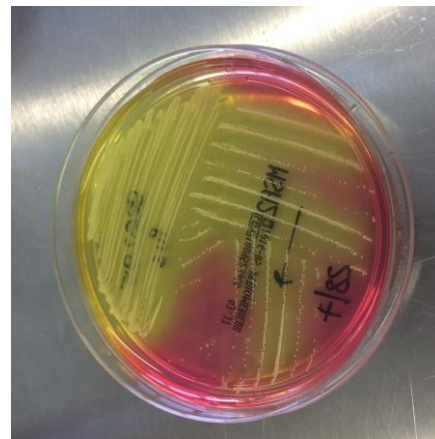


Figura 17 - Subcultura de cocos Gram positivo em Meio de cultura MSA positiva para *Staphylococcus aureus*. Fonte: SPC do CHMT

Gelose Columbia Colistina e Ácido Nalidixico + 5% de sangue de carneiro (CNA) é um meio de isolamento seletivo que permite o desenvolvimento das bactérias Gram positivo (Figura 18).

A gelose contém uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura dos microrganismos exigentes, como os estreptococos e a *Listeria*.

A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana.

A presença de ácido nalidíxico e colistina permite inibir a maioria das bactérias Gram negativo bem como os *Bacillus*. [7]

A utilização deste meios não substitui a identificação dos microrganismos isolados por testes bioquímicos e/ ou imunológicos, até porque, foram observadas algumas limitações.

No caso do MSA, a fermentação do manitol não é específica da espécie *Staphylococcus aureus*. Outros microrganismos que não os estafilococos podem desenvolver-se no meio. Além disso, é possível que algumas estirpes de estafilococos sensíveis à concentração do NaCl presente no meio sejam parcialmente inibidas.

No meio CNA, é possível que algumas estirpes de bactérias Gram positivo que tenham exigências específicas não se desenvolvam e bactérias Gram negativas possam desenvolver-se. Desta forma, em função das amostras analisadas e segundo os microrganismos detetados, é recomendado associar o meio CNA com meios não seletivos (GS E PVX).

A associação do meio MSA com o CNA pode também ocorrer. [7]

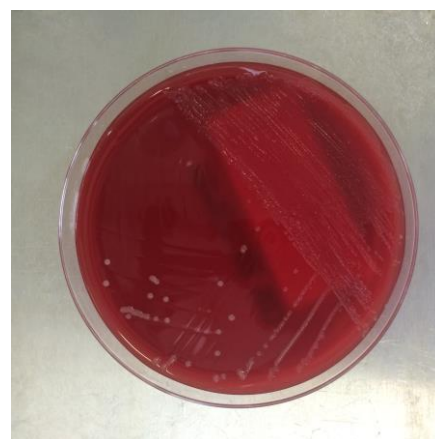


Figura 18 - Subcultura em meio CNA com isolamento de cocos Gram positivo. Fonte: SPC do CHMT

EXAME MICOBACTERIOLÓGICO

Outro exame realizado no setor de microbiologia é a pesquisa de micobactérias (Figura 19), bacilos ácido - álcool resistentes (BAAR). Nas amostras em que é pedido este exame, sendo a mais frequente a expetoração, é preparado um esfregaço diretamente a partir do produto, após descontaminação e homogeneização da amostra, para ser corado pela técnica de auramina, à exceção dos líquidos (LCR e líquidos de serosas), corados pela técnica de Ziehl Neelsen modificado (método de Kinyoun). A coloração de auramina é o método de eleição e

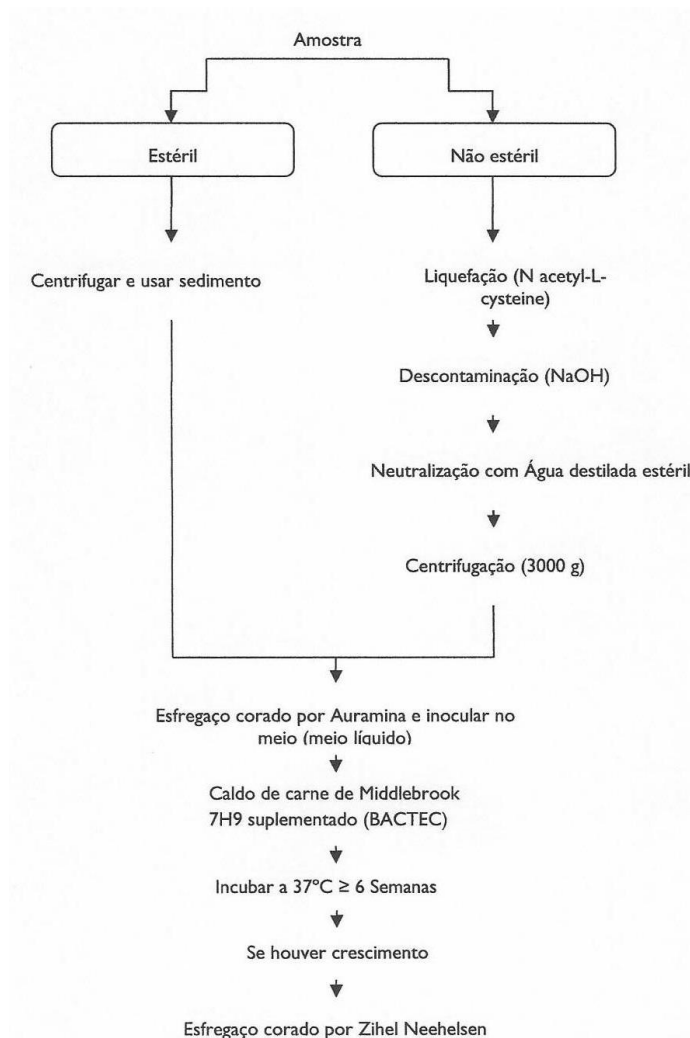


Figura 19 – Fluxograma do processamento de amostras para o isolamento de micobactérias. Fonte: Adaptado de [3]

o recomendado para laboratórios com microscópio de fluorescência, por se tratar de uma coloração mais sensível, que cora de amarelo – esverdeado as micobactérias, que ficam fluorescentes num fundo negro, o que permite distingui-las de outros microrganismos e estruturas celulares presentes na amostra. Outra das vantagens deste método é o facto de permitir a observação numa ampliação de 40x, o que permite a visualização de mais campos, num menor período de tempo, o que é muito útil, tendo em conta que, cada esfregaço deve ser observado cuidadosamente para que possa ser reportado como negativo. Ao contrário, basta a visualização de um BAAR, para que a amostra seja positiva. [3]

Quando BAAR são observados num esfregaço, os resultados devem ser quantificados, conforme tabela de quantificação em anexo VII, porque vai permitir inferir sobre a quantidade de bacilos excretados, bem como a extensão da infeção, importante em termos clínicos e epidemiológicos. [3]

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade da observação do esfregaço (20-80%), a ocorrência de artefactos durante o processo de coloração pode conduzir a resultados falsos positivos. Por esta razão, em caso de dúvida, um resultado positivo deve ser confirmado, com novo esfregaço corado por Ziehl-Neelsen ou observação por outro técnico/ especialista. [3]

A maioria das amostras processadas para a pesquisa de micobactérias contém outros microrganismos contaminantes, pelo que, o laboratório deve processar estas amostras, de modo a que as bactérias contaminantes, que rapidamente podem superar as micobactérias, sejam neutralizadas e as micobactérias sejam libertadas das mucinas. [3]

Depois da descontaminação, realizada pelo método de Kubica e Dye - N-acetil-L-cisteína (NALC) – NaOH, as amostras são concentradas por centrifugação (3000 g durante 15 minutos), para facilitar a deteção das micobactérias nos esfregaços e nas culturas. [3]

A descontaminação é neutralizada, pela adição de água destilada estéril, ao fim de 15 minutos à temperatura ambiente. [3]

Infelizmente, não existe um método ideal de descontaminação e os laboratórios, confrontados com as limitações dos vários métodos, tentam moderar este processo, por forma a garantir o máximo de sobrevivência das micobactérias e a eliminação das bactérias contaminantes. Desta forma, o processo de descontaminação é neutralizado, ao fim de 15 minutos, por adição de água destilada estéril. A taxa de contaminação não deve exceder os 5%. [3]

Amostras de tecidos ou fluidos corporais colhidos assepticamente, normalmente, não requerem a utilização dos normais métodos de descontaminação. [3]

Depois destes procedimentos, a amostra (0,5 - 1mL) é inoculada no caldo de carne de Middlebrook 7H9 suplementado, com uma mistura de antibióticos, para suprimir a flora normal associada com as amostras digeridas e descontaminadas e aumentar a recuperação de micobactérias. A amostra é incubada a 37°C no sistema Bactec 9000MB, sendo o frasco agitado a cada 10 minutos para obter um isolamento ótimo. A respiração dos microrganismos aeróbios viáveis presentes no meio origina uma depleção de oxigénio que provoca um aumento da fluorescência do sensor do meio. O sensor é monitorizado pelo instrumento relativamente ao aumento de fluorescência. Uma leitura positiva indica a presença presuntiva de micobactérias viáveis no meio. [3]

Antes da inoculação, deve confirmar-se o pH da amostra, que deve estar entre 6,8 – 7,0. Caso seja necessário deve corrigir-se com NaOH 4% ou HCl 0,1N.

O desenvolvimento das micobactérias é lento e por isso exige períodos de incubação prolongados, cerca de 42 dias.

Caso ocorra crescimento, o sistema notifica a presença de culturas positivas, o que, normalmente, ocorre ao fim de 3 a 6 semanas de incubação. Nestes casos, os frascos das

culturas são removidas do sistema e efetuado um esfregaço para coloração pelo método de Ziehl Neelsen modificado (método de Kinyoun), que servirá para verificar se a amostra é positiva para BAAR ou se é uma amostra contaminada. A utilização da coloração de Ziehl Neelsen modificado deve-se ao facto de se tratar de um esfregaço preparado a partir de uma cultura, onde a probabilidade de encontrar BAAR é muito maior, relativamente ao obtido diretamente do produto. Além disso, permite a visualização de cordas (Figura 20), características das micobactérias em cultura.

A visualização de BAAR é apenas uma evidência presuntiva de tuberculose. Nestes casos, a cultura é enviada ao INSA, para identificação e antibiograma.

As amostras que se revelem contaminadas, ou seja, se observe a presença de outros microrganismos (Bactérias/ Leveduras) são submetidas a um novo processo de descontaminação e incubação. Se no final deste novo período, continuarem contaminadas são descartadas e uma nova amostra deve ser solicitada. [3]

Na figura 20 está representado um esfregaço de uma cultura positiva para BAAR, corado pela técnica de Ziehl Neelsen modificado (método de Kinyoun), obtida de um Aspirado Brônquico de um individuo do sexo masculino, imunocomprometido.

Os testes de identificação e determinação das suscetibilidade aos antimicrobianos, efetuados pelo INSA, confirmaram a infeção por micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. A estirpe identificada apresenta resistência apenas a um dos fármacos de 1ª linha, usado no tratamento, o aminoglicosídeo estreptomicina, conforme relatório em anexo VIII.



Figura 20 – Esfregaço de uma cultura positiva para BAAR, corado pela técnica de Ziehl Neelsen modificado (método de Kinyoun), obtida de um Aspirado Brônquico.
Fonte: SPC do CHMT

Recentemente, o SPC dispõe de um novo equipamento e uma nova metodologia para a deteção de *Mycobacterium tuberculosis*, o GeneXpert e a PCR (Polimerase chain reaction) em tempo real. Neste equipamento também é feita a pesquisa dos vírus influenza (A, H1N1 e B), pela deteção do ARN (Ácido Ribonucleico).

PROVAS DE IDENTIFICAÇÃO

Neste setor, são ainda realizados testes rápidos e simples que permitem identificar/diferenciar microrganismos.

Teste da Catalase: A enzima Catalase desdobra o peróxido de hidrogénio (3%) em água e oxigénio ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Para a deteção desta enzima, numa lâmina de vidro, coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 3% e, com o auxílio de uma ansa, adiciona-se uma colónia do microrganismo a testar. Caso o teste seja positivo, observa-se de imediato a formação de bolhas de gás (O_2). É um teste utilizado principalmente para diferenciar *Staphylococcus spp.* de *Streptococcus spp.*, uma vez que os *Staphylococcus spp.* são catalase positiva e os *Streptococcus spp.* não. [3]

Devido à existência de catalase nos eritrócitos, a prova deve ser interpretada com muito cuidado quando efetuada a partir de colónias retiradas de meios contendo sangue (possibilidade de falso positivo). [2]

Teste da Oxidase (Método de Kovac's): é um teste utilizado para a deteção da presença da enzima citocromo oxidase. São utilizados discos impregnados com tetrametil-p-fenilenodiamina. Com o auxílio de uma ansa (não metálica), coloca-se sobre o disco uma colónia do microrganismo a testar. O teste é considerado positivo se o disco adquirir uma cor púrpura, em mais ou menos 10 segundos. As *Enterobacteriaceae* são negativas para este teste, ao contrário das *Pseudomonas spp.* [3]

Não devem ser usadas ansas de metal pois os produtos de oxidação do metal, que se formam aquando do aquecimento da ansa, podem provocar falsa reação positiva.

Teste da Urease: utilização de um meio de cultura ureia-indol e posterior inoculação com o microrganismo a testar. Se ocorrer a hidrólise da ureia por ação da urease com produção de amónia, o meio fica alcalino, mudando de cor de amarelo para carmim devido ao indicador de pH do meio. Esta reação ocorre espontaneamente. O *Proteus spp.* realiza a hidrólise da ureia. [3]

Teste da Coagulase livre (em tubo): permite estudar a capacidade que o microrganismo tem em formar coágulos quando adicionado ao plasma. A coagulase converte o fibrinogénio em fibrina, conseqüentemente ocorre a formação do coágulo. A formação ocorre num período de 4 horas a 35°C-37°C. A importância clínica deste teste recai sobre o facto de que,

permite-nos distinguir o *Staphylococcus aureus*, que é coagulase positiva de outros *Staphylococcus spp.* [3]

Teste de resistência à Optoquina: a optoquina é um derivado de quinina que se difunde facilmente num meio de cultura sólido e inibe o crescimento do *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição da cultura em placa. Este teste é usado para diferenciar o *Streptococcus pneumoniae* (previsivelmente sensível à ação da optoquina) de outros estreptococos produtores de α – hemólise (previsivelmente resistentes à optoquina). [3]

Exame a fresco com contraste negativo por Tinta da china

A coloração por tinta da china é utilizada para evidenciar a presença de *Cryptococcus spp.*, em amostras biológicas, nomeadamente LCR, ou a partir de colónias em cultura, conforme IT.SPC.032.00 (Anexo IX).

A infeção por *Cryptococcus spp.* embora rara em indivíduos saudáveis, pode ocorrer em indivíduos imunodeprimidos, em fase avançada de doença pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). [10]

A tinta-da-china, utilizada como material contrastante, é excluída pela cápsula polissacarídea do *Cryptococcus spp.* e cria um halo transparente ao redor da célula fúngica (Figura 21). [3]

Na figura 21 está representado um exame a fresco com contraste negativo de uma amostra de sangue, obtida de um indivíduo do sexo feminino, imunocomprometido, com infeção VIH, não vigiado.

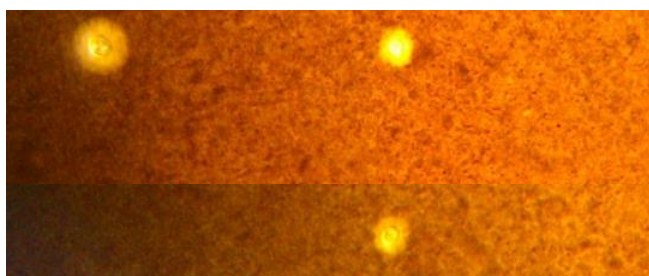


Figura 21 – Exame a fresco com contraste negativo por tinta-da-china de colónias de subcultura em GS, obtida a partir de uma hemocultura positiva para *Cryptococcus neoformans*. Fonte: SPC do CHMT

A informação obtida com Exame a fresco com contraste negativo por tinta-

da-china, ainda que presuntiva, foi imediatamente transmitida ao corpo clínico e procedeu-se à identificação, que confirmou a presença de *Cryptococcus neoformans*.

Oxoid Dryspot™ Pneumo Test: consiste num teste de aglutinação de latex que permite a deteção do antigénio capsular de *Streptococcus pneumoniae*, a partir de colónias.

É um teste de aglutinação que se baseia na reação entre o antigénio capsular de *Streptococcus pneumoniae* e as partículas de latex sensibilizadas com o anticorpo complementar específico. Caso haja aglutinação o teste é considerado positivo. [12]

PROVA DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Após a observação do exame direto (pela coloração de Gram) e do exame cultural, são realizados testes de identificação e de suscetibilidade aos antibióticos em equipamentos automáticos. No SPC do CHMT existem dois equipamentos automáticos para a realização destes testes: o *Vitek[®]2 Compact* da bioMérieux™ e o *MicroScan WalkAway 96* da Beckman Coulter.

O *Vitek[®]2 Compact* é um sistema automatizado para a realização de testes de identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) de bactérias Gram positivo, Gram negativo, *Neisserias/ Haemophilus/ Campylobacter*, leveduras e outros organismos fastidiosos.

Para a execução destes testes é necessário preparar uma suspensão em 3ml de solução salina, com a turvação padronizada segundo a escala de McFarland.

Nos testes de identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos devem ser utilizadas culturas em meios não seletivos (GS ou PVX) e com um máximo 48 horas.

As cartas de Identificação (ID) têm poços com hidratos de carbono e enzimas que permitem a identificação dos microrganismos, por metodologia colorimétrica.

As cartas TSA são constituídas por poços impregnados com antimicrobianos onde se determinam a Concentração Mínima Inibitória (CMI), a partir de diluições sucessivas e interpretadas segundo as normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Tabela V. Carta ID e TSA utilizado para determinados microrganismos e indicação da turvação necessária na suspensão para a realização dos mesmos no sistema Vitek2 Compact.

Gram	Carta ID	Turvação	Microorganismo/ Característica	TSA
Positivo	GP	0.60 – 0.63 McF	<i>Staphylococcus spp.</i>	TSA-P619
			<i>Enterococcus spp.</i>	TSA-P586
			<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos, <i>Streptococcus</i> Grupo Viridans	TSA-ST01
			<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TSA-P576
Negativo	GN	0.60 – 0.63 McF	<i>Enterobacteriaceae</i> em urinas e outros produtos	TSA-N192
			Só para urinas	TSA-N244
			Oxidase positiva	TSA-N222
Leveduras	YST	1.80 – 2.20 McF		
	ANC	2.70 – 3.30 McF	<i>Corynebacterium</i>	
	NH	2.70 – 3.30 McF	<i>Neisseria spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i>	

GP, Gram positivo; GN, Gram negativo; YST, Fungos; ANC, Anaeróbios e *Corynebacterium*; NH, *Neisseria* e *Haemophilus*; TSA, Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

O MicroScan WalkAway 96 é um sistema automatizado, que utiliza painéis combinados, para a realização dos testes de identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos. Este instrumento utiliza o método de espectrofotometria na leitura.

Tabela VI. Painéis de Identificação e Suscetibilidade aos antimicrobianos para os diferentes microrganismos no sistema MicroScan WalkAway 96.

Gram	Painel	Microorganismo/ Característica
Positivo	Combo 42	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
Negativo	Combo 69	<i>Enterobacteriaceae</i> em urinas
	Combo 70	
	Combo 71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Para mais informação, por vezes são utilizados meios de cultura cromogêneos, como é o caso da gelose chromID CARBA (CARB).

CARB é um meio cromogêneo que permite o rastreio de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (EPC), nomeadamente do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e os organismos que contêm o gene codificado New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), em pacientes portadores crónicos ou doentes de risco, conforme orientação DGS 006/2010, de 04/10/2010 (Anexo X).

As EPC são bactérias particularmente multirresistentes que podem ser responsáveis por infeções nosocomiais e epidemias hospitalares. A deteção dos portadores das EPC é particularmente importante para a prevenção e o seguimento epidemiológico destas infeções. Neste contexto, a utilização da gelose chromID CARBA contribui para a vigilância ativa das EPC, microrganismos “alerta” de notificação obrigatória à Direção Geral de Saúde (DGS) e ao INSA, em cumprimento da Norma DGS 004/2013, de 08/08/2013, atualizada em 13/11/2015 (Anexo XI).

Este meio é constituído por uma base nutritiva rica que associa diferentes peptonas e uma mistura de antibióticos que permite o crescimento seletivo das EPC.

A presença de três substratos cromogêneos permite identificar as EPC mais frequentemente isoladas: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*. [7]

As estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β -glucoronidase e/ ou β -galactosidase formam colónias de coloração espontânea rosa a bordô. As estirpes de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, que exprimem uma β -glucosidase formam colónias de coloração azul/ esverdeada (Figura 22). [7]

O alastramento global de espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, ou seja, organismos não suscetíveis a carbapenemos é um problema médico e de saúde pública grave. Estas bactérias são normalmente resistentes a todos os beta-lactâmicos e frequentemente co-resistentes a diversas classes de outros agentes antimicrobianos, verificando-se uma grande limitação no tratamento. A determinação do alastramento das EPC é uma tarefa complexa devido à diversidade de enzimas hidrolisantes de carbapenemos que têm surgido e à capacidade dos genes para se disseminarem entre as diversas espécies bacterianas, tais como os determinantes de KPC e os organismos que contem o gene codificado NDM, que têm uma vantagem seletiva em unidades hospitalares onde a utilização antimicrobiana é elevada. [14]



**Figura 22 - *Klebsiella pneumoniae* em meio chromID CARBA.
Fonte: SPC do CHMT**

Com o objetivo de facilitar a capacidade dos programas de controlo de infeções no que respeita à interrupção do alastramento de EPC em hospitais e outras unidades de cuidados de saúde, foram desenvolvidos métodos de biologia molecular, rápidos e rigorosos para o rastreio dos doentes relativamente à colonização com EPC em unidades de cuidados de saúde.

Nesse sentido, o SPC do CHMT introduziu recentemente o Ensaio Xpert Carba R- Assay, executado nos sistemas do instrumento GeneXpert®. Este ensaio consiste num teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a deteção e diferenciação rápida das sequências de genes, associados às EPC, a partir de amostras de zaragatoas rectais em doentes em risco de colonização intestinal com EPC. O teste utiliza a reação em cadeia de polimerase (PCR) automática em tempo real.

O ensaio Xpert Carba R- Assay não se destina a orientar ou monitorizar o tratamento de infeções por EPC. [14]

CONTROLO DE QUALIDADE

Para haver Qualidade do Laboratório é necessário controlar todas as etapas do processo, desde a fase pré-analítica até à fase pós-analítica. Neste contexto, todas os setores analíticos do SPC do CHMT realizam um CQI e participam em programas de AEQ.

Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O CQI é um processo estatístico utilizado para monitorizar e avaliar o processo analítico. Os resultados do CQI são usados para validar a operacionalidade do equipamento dentro das especificações pré-definidas, evidenciando que os resultados das amostras dos pacientes são fiáveis. [15]

Através do CQI controlamos a precisão e reprodutibilidade dos métodos, vigiando a incidência de erros aleatórios.

O erro sistemático é evidenciado pela alteração na média dos valores do controlo. A alteração na média pode ser gradual e demonstrada como uma tendência nos valores do controlo ou pode ser abrupta e demonstrada como um desvio nos valores do controlo. [16]

No setor de Microbiologia o CQI é assegurado com a cultura e testes de identificação e suscetibilidade aos antibióticos em sistemas automáticos, utilizando estirpes ATCC® (American Type Culture Collection), com características fenotípicas previamente conhecidas, o que permite avaliar os procedimentos utilizados para a realização destes testes e instituir medidas corretivas, caso sejam detetados erros.

As culturas a utilizar são quase sempre obtidas a partir das culturas de trabalho. Quando não há culturas de armazenamento, utiliza-se uma estirpe nova, fazendo-se uma subcultura da cultura original, seguindo o procedimento descrito na IT.SPC.044 (Anexo XII).

O controlo de qualidade interno realiza-se com uma periodicidade mensal (Semanalmente é testada uma estirpe ATCC® diferente), conforme estipulado na IT.SPC.045.01 (Anexo XIII).

Quinzenalmente, é efetuado o CQI dos vários tipos de coloração utilizadas neste setor.

A temperatura das estufas e dos frigoríficos são também controlados e registados, com uma periodicidade bi-diária.

Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

O Programa de AEQ baseia-se na avaliação retrospectiva do desempenho dos Laboratórios. Permite melhorar a comparabilidade dos resultados, rastreabilidade das medições e desempenho dos métodos.

Se o resultado da participação no ensaio não for aceitável, é procurada a causa possível e aplicada (s), se for caso disso, a (s) ação (ões) corretiva (s) e preventiva (s).

O setor de microbiologia participa em vários programas de AEQ (Tabela VII):

Na Bacteriologia, é utilizado o programa do *United Kingdom National External Assessment Service* (UKNEQAS). Por ano são executados 12 ensaios, em cada um são processadas 5 amostras, 3 para identificação de microrganismos e 2 para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Para as áreas da parasitologia e micologia, é utilizado o programa do INSA. Por ano são realizados 3 ensaios parasitológicos e 3 micológicos, sendo que cada ensaio compreende 3 amostras.

Por último, para a cultura e descontaminação de *Mycobacterium tuberculosis*, o SPC utiliza o programa da Society for Promoting Quality Assurance in Medical Laboratories (INSTAND), com uma periodicidade semestral. Por ano são executados 2 ensaios, compreendendo cada um deles 5 amostras. Regra geral, os ensaios são executados na Primavera e no Outono. Os períodos do ano normalmente coincidentes com picos sazonais de infeção por *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabela VII – Programas de AEQ no setor da microbiologia

INSTITUTO	ÁREA ANALÍTICA	PERIODICIDADE
UKNEQAS	Bacteriologia Geral	MENSAL 5 Amostras/ mês 2 amostras para Identificação 3 amostras para Antibiograma
		TRIMESTRAL 3 Amostras/ ensaio
INSA	Parasitologia	TRIMESTRAL 3 Amostras por ensaio
	Micologia	TRIMESTRAL 3 Amostras por ensaio
INSTAND	Cultura e descontaminação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	SEMESTRAL (2 ensaios/ ano: Primavera e Outono. 5 amostras/ ensaio)

UKNEQAS, *United Kingdom National External Assessment Service*; INSTAND, Society for Promoting Quality Assurance in Medical Laboratories; INSA, *Instituto Nacional Saúde Doutor Ricardo Jorge*;

2.2 – Setor de Imunologia

Este setor realiza a determinação de diversos parâmetros como: marcadores tumorais, hormonas de reprodução, avaliação da função tiroidea, eletroforese e imunofixação das proteínas, do soro e da urina de 24 horas (Proteinúria de Bence Jones), estudo de proteínas específicas (complementos, ceruloplasmina, Imunoglobulinas, Transferrina...), serologia manual (Waller Rose), serologia automatizada (VIDAS), estudos de alergia e autoimunidade (Unicap e Mago).

No setor existe, ainda, um microscópio de fluorescência para estudos específicos de autoimunidade.

Dada a diversidade de parâmetros determinados no setor e, na impossibilidade de os abordar todos, foi feita uma descrição mais exaustiva de alguns estudos de autoimunidade.

Tem como amostra mais frequente o soro obtido após centrifugação, a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos, à temperatura de 15°C, a partir de uma amostra de sangue total, colhido para tubo com ativador da coagulação.

Antes da centrifugação, os tubos permanecem em repouso durante cerca de 15 a 20 minutos, até à retração do coágulo.

Os equipamentos usados neste setor, com especificação do método, parâmetros realizados e os respetivos valores de referência, encontram-se resumidos no anexo XIV.

2.2.1 - Equipamentos, princípios de funcionamento e técnicas manuais

Este setor é constituído por diversos tipos equipamentos, que no geral executam diferentes tarefas e determinações, que passo a descrever:

IMAGE 800



Figura 23 – Image 800 da Beckman Coulter.
Fonte: SPC do CHMT

Este sistema (Figura 23) realiza ensaios tendo como base a tecnologia de turbidimetria e nefelometria (detetor a 90° da fonte de luz incidente), para efetuar o doseamento de proteínas séricas e urinárias.

A turbidimetria mede a redução na transmissão da luz devido à formação de partículas, e quantifica a luz residual transmitida. A

nefelometria, por seu lado, deteta a porção de luz que é dispersa numa variedade de ângulos.

[17]

Os doseamentos turbidimétricos são efetuados com um espectrofotómetro, para determinar a concentração de partículas na amostra. A quantidade de luz bloqueada pelas partículas em suspensão depende da concentração mas também do tamanho destas. A deteção da luz transmitida faz-se num ângulo de 0° relativamente à luz incidente (Ilustração 1).

Na nefelometria, a dispersão da luz depende do comprimento de onda e do tamanho das partículas. A deteção de luz dispersa num ângulo entre 15° e 90° leva ao aumento da sensibilidade das determinações nefelométricas (Ilustração 1). [17]

A intensidade da luz dispersa é proporcional à concentração do analito na amostra.

Os imunocomplexos formados entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) de elevada afinidade, formam uma micela proteica com tamanho suficiente para dispersar a luz. A imunonefelometria é um método mais sensível que a turbidimetria, com limite de deteção mais baixo para proteínas séricas. [18]

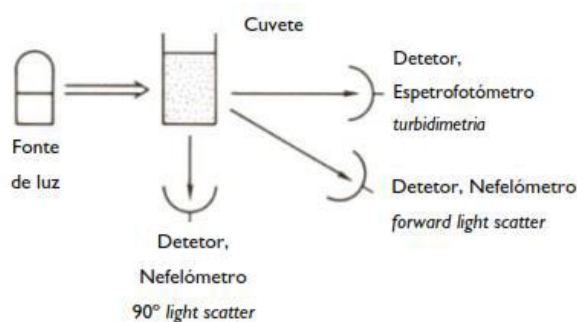


Ilustração 1 – Esquema representativo de ensaio nefelométrico e turbidimétrico realizado pelo Immage 800. Fonte: [19]

Autoanalisador VIDAS



Figura 24 – Autoanalisador VIDAS da Biomérieux

Este sistema (Figura 24) realiza ensaios tendo como base a tecnologia de imunoenaios marcados, por métodos não competitivos. *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) (Sanduíche e Captura de Imunoglobulina M - IgM).

No ensaio Sanduíche para detetar o Ac, o Ag imobilizado na fase sólida captura o Ac presente na amostra. Depois da lavagem, é adicionado um Ac marcado, que se liga ao complexo Ag - Ac. A quantidade de Ac marcado que se liga é diretamente proporcional à quantidade de Ac específico presente (Ilustração 2). [20]

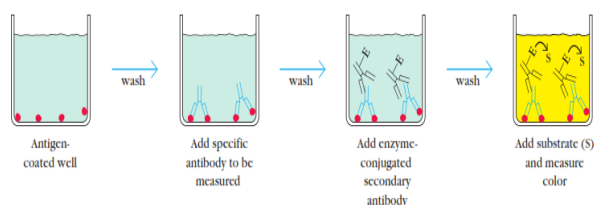


Ilustração 2 – Representação esquemática do Imunoensaio não-competitivo Sanduíche para deteção de Ac realizado no Autoanalisador VIDAS. Fonte: [20]

Autoanalisador UniCel Dxl 800



Figura 25 – UniCel Dxl 800 da Beckman Coulter.

Fonte: SPC do CHMT

Este sistema (Figura 25) realiza ensaios tendo como base a tecnologia de quimioluminescência e utiliza partículas paramagnéticas revestidas com anticorpos (Acs) específicos adsorvidos à superfície como fase sólida. Cada partícula é dispensada num tubo de reação com características próprias que serve como recipiente de incubação, lavagem e desenvolvimento do sinal.

De seguida a amostra é incubada com o Ac marcado com uma enzima (fosfatase alcalina). Posteriormente, a mistura é separada da partícula, fazendo com que o material excedente se acumule numa câmara superior do tubo. Seguem-se uma série de lavagens para assegurar que a partícula fica desprovida de qualquer fração não ligada. A fração ligada é então quantificada utilizando como substrato quimioluminescente o dioxiaceto que, ao reagir com a fosfatase alcalina ligada à partícula, promove a emissão de luz. A intensidade de luz emitida é detetada por um fotomultiplicador sendo o resultado, calculado com base numa curva padrão, transmitido em valores de concentração. [21]

ImmunoCAP™ 250



Figura 26 – ImmunoCAP™ 250 da ThermoFisher Scientific

Fonte: SPC do CHMT

Este equipamento (Figura 26) é utilizado no diagnóstico de alergias, que se baseia em técnicas imunoenzimáticas e que utiliza Acs marcados com um fluorocromo contra o complexo Ag/ Ac de interesse. A intensidade de fluorescência será proporcional à quantidade do analito na amostra (Ilustração 3). [22]



Ilustração 3 – Esquema representativo do Imunoensaio Fluoroenzimático realizado pelo Unicap 250. Fonte: www.phadia.com

EUROBlotMaster



Figura 27 – EUROBlotMaster da EUROIMMUN.
Fonte: SPC do CHMT

Este sistema (Figura 27) realiza ensaios qualitativos tendo como base a metodologia de imunoblot. São colocadas no dispositivo tiras de teste com linhas paralelas de antígenos (Ags). Numa primeira etapa da reação, as amostras diluídas dos doentes são incubadas juntamente com as tiras de teste de imunoblot. No caso de amostras positivas, os Acs específicos ligam-se ao local do Ag correspondente formando um imunocomplexo. Posteriormente liga-se a este imunocomplexo um conjugado enzimático que será revelado pela adição do substrato (Ilustração 4). A interpretação das tiras de teste é efetuada informaticamente utilizando o protocolo EUROLineScan (Figura 28). [23]

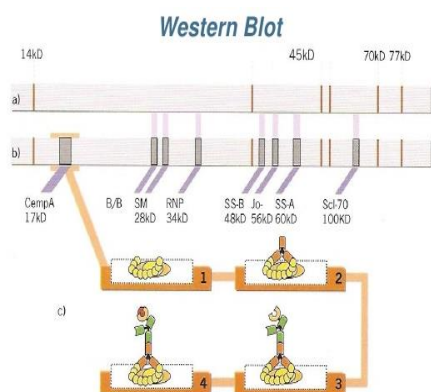


Ilustração 4 – Esquema representativo da técnica de imunoblotting realizada pelo EUROBlotMaster.

Fonte: www.euroimmun.com

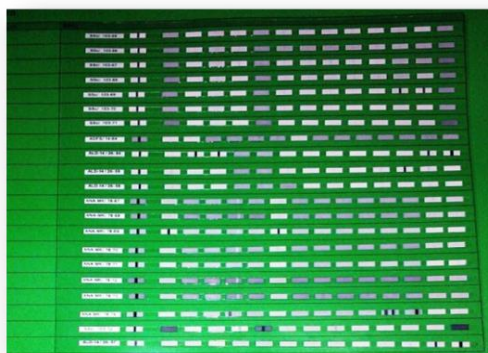


Figura 28 – Protocolo EUROLineScan.
Fonte: SPC do CHMT

Autoanalisador Mago Plus

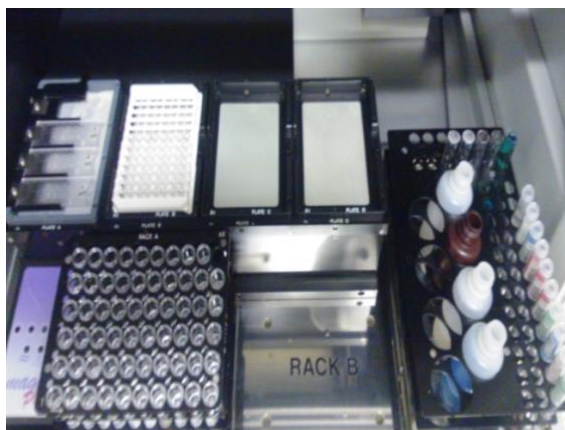


Figura 29 – Mago Plus da Diamedix (Isoder).
Fonte: SPC do CHMT

É um sistema que executa ensaios Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), e de Imunofluorescência indireta (IFI) em simultâneo (Figura 29).

O screening por IFI é o método de referência, para a pesquisa de autoanticorpos (AAcs), pois tem uma elevada especificidade. [24]

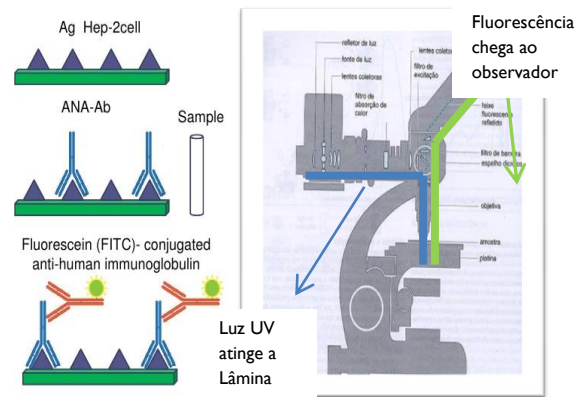


Ilustração 5 – Esquema representativo da técnica de IFI realizada pelo Autoanalisador Mago Plus
 Fonte: www.euroimmun.com

Na metodologia IFI, o Ag é a célula ou tecido montado na lâmina e o sistema de detecção é uma Imunoglobulina G (IgG) conjugada com um marcador fluorescente, posteriormente detetado num microscópio de fluorescência (Ilustração 5). [25]

O resultado é Semi quantitativo isto é, padrão de fluorescência e título.

Na figura 30, está representada uma imagem da técnica de IFI no Mago Plus.

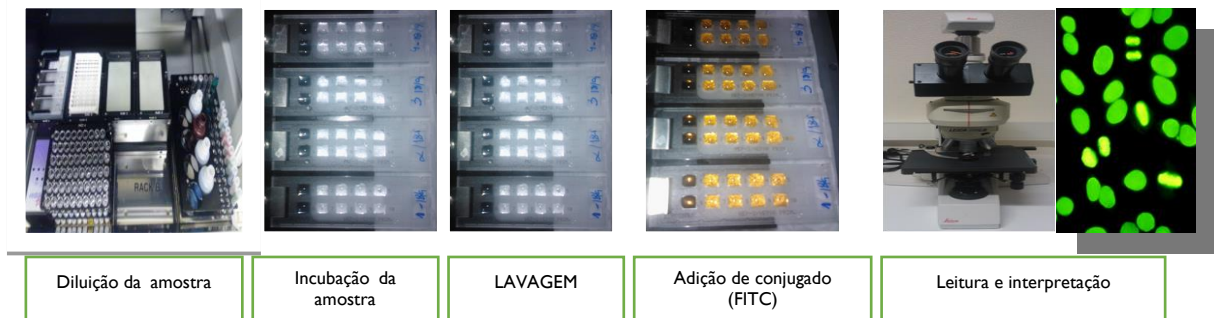


Figura 30 – Figura representativa da técnica de IFI no Mago Plus
 Fonte: SPC do CHMT

As amostras positivas e negativas originam grande diferença no sinal produzido, sendo possível determinar facilmente a distribuição do corante indicador (fluoresceína). Todas as áreas fluorescentes que não correspondem a um padrão típico são consideradas fluorescências inespecíficas. [24]

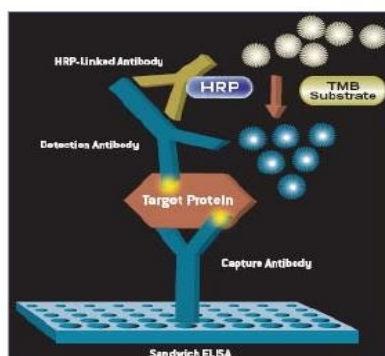


Ilustração 6 – Esquema representativo da técnica de ELISA realizada pelo Autoanalisador Mago Plus
 Fonte: www.euroimmun.com

A técnica ELISA usa as propriedades catalíticas das enzimas para detetar e quantificar reações imunológicas de Acs e Ags em circulação ou fixados nos tecidos. Normalmente, as amostras são diluídas e incubadas nas tiras de microtitulação contendo poços revestidos com Ags (nRNP/Sm, Sm, SSA, Ro52, SSB, Scl70, Jo-1, PCNA, PM-Scl, proteínas P ribossomais, Centrómeros).

Os Acs específicos na amostra ligam-se ao Ag. Numa segunda incubação, é adicionado um conjugado enzimático, que catalisa uma reação de cor lida por espectrofotometria (Ilustração 6). [26]

A concentração do Ac é determinada por comparação com curva padrão realizada com calibrador conhecido.

Na figura 31 está representada uma imagem da técnica de ELISA executada no Mago Plus.



Figura 31 – Figura representativa da técnica de ELISA no Mago Plus.
Fonte: SPC do CHMT

Se o resultado da análise for positivo, para diferenciação, realiza-se um ensaio qualitativo, tendo por base a tecnologia de imunoblotting. [24]

Autoanalisador Access 2

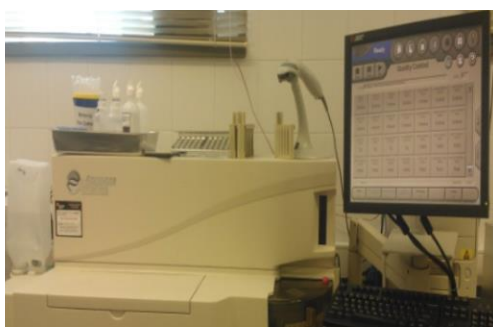


Figura 32 – Access 2 da Beckman coulter
Fonte: SPC do CHMT

Este equipamento (Figura 32) realiza ensaios imunoenzimáticos competitivos e não competitivos, com protocolo semelhante ao Unicell Dxl 800, anteriormente descrito. Utiliza, como fase sólida, partículas paramagnéticas revestidas com Acs. A amostra incuba com um conjugado, marcado com uma enzima, a fosfatase alcalina, a camada ligada ao Ac da fase sólida é quantificada usando o dioxetano como

substrato quimioluminescente. [21]

Sebia Hydrasys®



Figura 33 – Sebia Hydrasys da ThermoFischer Scientific. Fonte: SPC do CHMT

Equipamento (Figura 33) semiautomático destinado à eletroforese e imunofixação de proteínas. É constituído por dois módulos que funcionam de modo independente. O da esquerda é destinado à corrida eletroforética sendo apenas necessário colocar o gel de agarose e um “pente” aplicador da amostra.

No caso de ser uma imunofixação é ainda necessário um passo extra no qual é usada uma “máscara” que serve para aplicar os Acs. O módulo da direita destina-se à coloração e secagem do gel de forma a revelar o resultado. [22]

2.2.2 - Autoimunidade

A principal tarefa do Sistema Imunitário (SI) é a defesa e manutenção da integridade do organismo mediante o reconhecimento e a eliminação de substâncias estranhas e nocivas, microrganismos, toxinas e células malignas. No processo de desenvolvimento do SI, este aprendeu a inativar respostas destrutivas a substâncias endógenas e a evitar a lesão irreparável dos tecidos. [27]

Quando o SI responde inapropriadamente contra o próprio organismo, surgem as Doenças Autoimunes (DAIs).

A Doença Autoimune (DAI) pode ser definida como a resposta imunitária adaptativa com especificidade para autoantígenos (AAgs). Os AAcs são Acs direcionados para os componentes celulares normais, os AAgs. A maioria dos indivíduos saudáveis produz alguns AAcs, embora em níveis muito baixos, baixa afinidade e requerem testes sensíveis para a sua deteção. A deteção destes AAcs não representa qualquer vantagem no diagnóstico de DAI. [28]

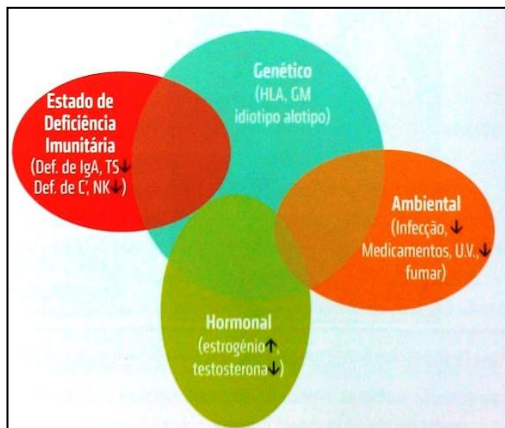
Os AAcs de elevada afinidade, detetados em testes de rotina, são também encontrados em indivíduos saudáveis, especialmente mulheres grávidas e idosos. [28]

Estima-se que após a recombinação genética aleatória das imunoglobulinas mais de metade dos recetores de células B resultantes tem especificidade para AAgs. O controlo da ontogenia das células B previne a produção de AAcs. Muitas destas células auto reativas modificam os seus recetores através da edição de novos. As que não o conseguem fazer são detetadas ou tornam-se não funcionais. [28]

A DAI ocorre quando as células T auto reativas ou AAcs causam lesão através de reações de hipersensibilidade do tipo II e IV. Ao contrário dos Ags infecciosos, os AAgs são quase impossíveis de eliminar, apesar do esforço do SI. As DAIs são comuns e causam, normalmente, doença crónica que dura meses ou anos, não havendo cura. Podem afetar qualquer órgão e ocorrem em qualquer idade. As hipóteses para as causas da DAI incluem os AAcs naturais, mas existem evidências que são as células T que iniciam a doença. [28]

Todos os métodos para ajudar no diagnóstico das DAIs dependem da detecção de AAcS, utilizando os equipamentos e as metodologias descritas. [28]

O estudo das DAIs tem tido uma enorme expansão e sabemos hoje que o desenvolvimento



destas doenças depende de vários fatores de risco no mesmo indivíduo, ao mesmo tempo, tais como: fatores genéticos, imunológicos, ambientais ou hormonais (Ilustração 7). [29]

Ilustração 7 – Esquema representativo da Etiopatogenia multifatorial das doenças autoimunes. Mosaico da autoimunidade: Fatores de Risco para o desenvolvimento de Doença Autoimune
Fonte: [29]

Embora os antecedentes genéticos sugiram o desenvolvimento da DAI numa família em particular, uma diferença no nível hormonal ou fatores ambientais (vírus, medicamentos, exposição aos raios ultra violetas do sol) poderão induzir diferentes DAIs nos vários membros da mesma família. [29]

As DAIs podem ser sistêmicas ou específicas de órgão (Tabela VIII). [29]

Tabela VIII – Algumas Doenças Autoimunes sistêmicas e específicas de órgão. [29]

Específicas de Órgão	Sistêmicas
Diabetes Mellitus Tipo I	Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)
Hepatite Autoimune Tipo I	Artrite Reumatóide (AR)
Cirrose Biliar Primária	Esclerose Múltipla
Doença Celíaca	Esclerose Sistêmica (ES)
Miastenia Gravis	Síndrome de Sjögren (SS)

Conforme os casos, quase todos os testes laboratoriais podem ter interesse. No entanto, os que são mais utilizados na prática diária são o hemograma, os marcadores de fase aguda e os AAcS. [29]

Embora, o diagnóstico da doença resulte da interpretação de um conjunto de testes, neste relatório foram abordados com maior ênfase alguns AAcS, Anticorpos Antinucleares (ANA) e principais DAIs associadas.

As DAIs sistêmicas (Tabela IX) são caracterizadas pelo aparecimento de AAcS dirigidos contra componentes celulares, que se encontram em todo o organismo, resultando em lesão tecidual, numa alteração funcional da homeostase fisiológica. [29]

Tabela IX – Algumas doenças autoimunes sistêmicas e seus antígenos. [29]

Doença Autoimune Sistêmica	Antígeno (Self)
Esclerose Múltipla	Cérebro e matéria branca
Artrite Reumatoide (AR)	Tecido conectivo
Esclerose Sistêmica	Coração, Pulmão, Rim, Trato gastrointestinal
Síndrome de Sjögren (SS)	Glândulas salivares, Fígado, Rim, Tireoide
Lupus Eritematoso Sistêmico (LES)	DNA, Proteínas Nucleares, Membranas dos Eritrócitos e Plaquetas

DNA, Ácido Desoxirribonucleico;

As DAIs específicas de cada órgão são caracterizadas pelo aparecimento de AAcS contra Ags presentes nesses órgãos (Tabela X). [29]

Tabela X – Principais anticorpos nas doenças autoimunes específicas de órgão. [29]

Órgão	Anticorpo	Patologias Associadas
Fígado	ANA, ASMA AMA M2, gp210, sp100	Hepatite Autoimune Tipo I Cirrose Biliar Primária
Intestino	Endomísio Transglutaminase IgG, IgA Gliadinas IgG, IgA	Doença Celíaca
Músculo	Recetores de Acetilcolina	Miastenia Gravis

ANA, Anticorpos Antinucleares; ASMA, Anticorpos Anti Musculo Liso; AMA M2, Anticorpos Anti Mitocôndria fração M2; gp210, Glicoproteína de 210 KDa; Sp 100, Proteína ácido solúvel de 100 KDa; IgG, Imunoglobulina G; IgA, Imunoglobulina A.

A pesquisa e identificação dos AAcS ANA é fundamental para o diagnóstico destas patologias e têm sido determinados por IFI durante décadas. Na tabela XI está representada a prevalência de ANA nas DAIs.

i) Pesquisa de Anticorpos Antinucleares (ANA)

Tabela XI – Prevalência de ANA nas doenças autoimunes. [30]

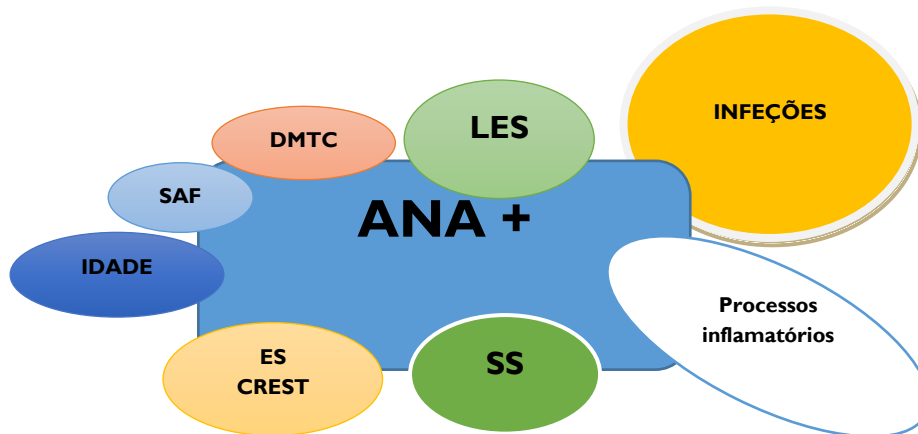
Doenças autoimunes	Prevalência de ANA	
Doenças em que ANA é muito útil para o diagnóstico		
Lupus Eritematoso Sistémico	Ativo	95-100%
	Inativo	80-100%
Síndrome do Lupus Neonatal		<90%
Esclerose Sistémica ou Esclerodermia		60-80%
Cirrose Biliar Primária		95-100%
Doenças em que ANA é moderadamente útil para o diagnóstico		
Síndrome de Sjörgen		40-70%
Poliomiosite e Dermatomiosite		30-80%
Doenças em que ANA é útil para a monitorização ou prognóstico		
Artrite juvenil crónica com uveítes		20-50%
Fenómeno de Raynaud		20-60%

Tabela XI – Continuação

Condições em que ANA é critério de diagnóstico	
Lúpus Eritematoso medicamentoso	≈ 100%
Hepatite autoimune	≈ 100%
Doença mista do Tecido Conjuntivo	≈ 100%
Doenças para as quais ANA não é útil para o diagnóstico	
Artrite Reumatoide	30-50%
Outras Doenças Reumáticas	20-50%
Esclerose Múltipla	25%
Púrpura Trombocitopenia Idiopática	10-30%
Colite Ulcerosa	26%
Lúpus Discoide Crónico	5-25%
Tiroidite	30-50%

No entanto, resultados positivos devem ser interpretados com cautela e tendo por base a informação clínica do doente em causa (Ilustração 8).

Os idosos e as mulheres grávidas apresentam frequentemente títulos positivos, ainda que baixos, de ANA, assim como os doentes com infeções crónicas, neoplasias, febre reumática e outras patologias. [30]



SAF, Síndrome anti fosfolipídico; ES, Esclerose Sistêmica; CREST, Síndrome de Crest; SS, Síndrome Sjögren; DMTC, Doença mista do tecido conjuntivo; LES, Lupus Eritematoso Sistêmico

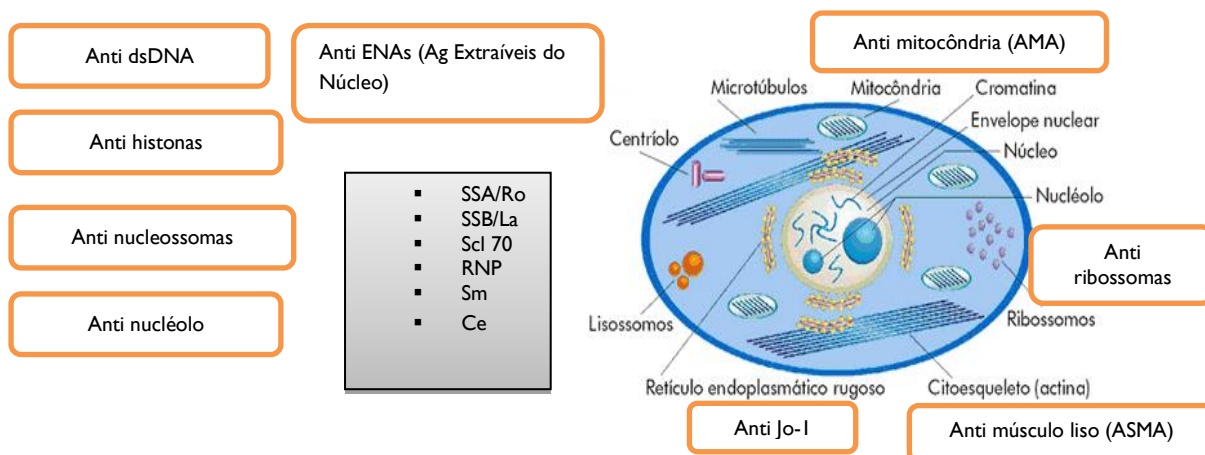
Ilustração 8 – Diagrama representativo da complexidade na interpretação do resultado positivo de ANA.

Fonte: SPC do CHMT

ANA são AAcS dirigidos contra uma variedade de componentes do núcleo da célula. O termo ANA é utilizado para todos os Acs que podem ser visualizados por IFI em substrato de HEp-2. [30]

ANA podem, de modo grosseiro, ser divididos em cinco grupos: os que reconhecem Acs do envelope celular, dos organelos do nucleoplasma, do nucléolo, do aparelho mitótico e do citoplasma (Ilustração 9). Por esta razão, o termo ANA foi considerado desatualizado. [30]

Algumas das proteínas nucleares, alvo dos AAcS, foram extraídas de células do timo, baço e cultura de células e foram agrupados sob a denominação de Acs Extraíveis do Núcleo (ENA). [30]



dsDNA, Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla; Ag, Antígeno

Ilustração 9 – Representação esquemática de núcleo celular em interfase e exemplos de imunoglobulinas que reagem contra componentes nucleares e citoplasmáticos.

Fonte: Bras Patol Med Lab 2007

A utilização de células HEp-2 (Carcinoma Laríngeo Humano tipo 2) como principal substrato na pesquisa de ANA por IFI tem como vantagem apresentarem um grande núcleo, muitos nucléolos, grande variedade de Acs nucleares (todos os Acs presentes numa célula eucariótica), citoplasma abundante e um grande potencial mitótico. São células que se podem propagar indefinidamente em cultura de células, e como tal o substrato pode ser mais facilmente padronizado. A elevada sensibilidade presente nas técnicas de IFI em substrato de células HEp-2, contrasta com a sua baixa especificidade: apenas alguns padrões são específicos de alguns Acs e muitas especificidades diferentes, dão origem a padrões semelhantes. [30]

A crescente necessidade de efetuar a pesquisa de ANA levou a uma evolução técnica e ao desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico, como ELISA, imunoenaios quimioluminescentes, imunoenaios fluoroenzimáticos e imunoblotting. [29]

A IFI ainda hoje, é o método de referência para o rastreio e determinação semi-qualitativa de ANA e Acs anti citoplasmáticos no soro humano, porque permite detetar facilmente um grande número de Acs com uma tripla vantagem: facilidade de execução, sensibilidade e possibilidade de detetar vários Acs ao mesmo tempo. [29]

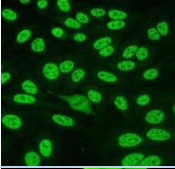
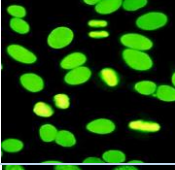
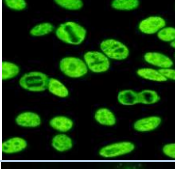
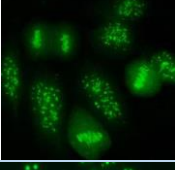
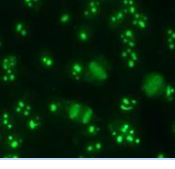
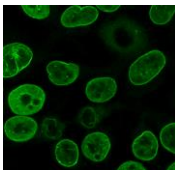
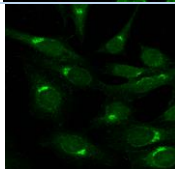
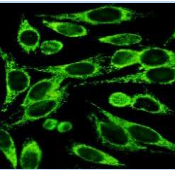
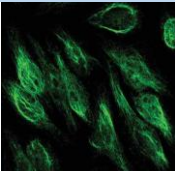
Para o efeito são utilizadas lâminas com dois substratos: células HEp-2 (maioritariamente nas fases do ciclo celular mitose e interfase) e corte de fígado de primata. A combinação do substrato células HEp-2 com fígado de primata permite a confirmação e diferenciação de resultados logo na fase de triagem. A comparação dos padrões de fluorescência permite uma maior diferenciação dos Acs nucleares (UI-nRNP, Sm, dsDNA, histonas e pontos nucleares) que reagem com células HEp-2 e fígado com a mesma intensidade, enquanto os Acs de SS-A, SS-B, centrómeros e ciclina apresentam uma fluorescência muito mais fraca no tecido do fígado. [23]

Os Acs pesquisados por IFI em substrato de células HEp-2 estão associados a determinados padrões de imunofluorescência, que embora não permitindo uma identificação definitiva da especificidade subjacente, podem, tanto o título como o padrão, ser muito informativos, por serem característicos dos Acs procurados. O componente nuclear no qual se localiza o Ag e que é reconhecido pelo ANA, vai determinar o padrão visual que se observará por imunofluorescência (Tabela XII). [23]

Os Acs originam padrões de fluorescência brilhante, verde maçã, característicos no núcleo, nucléolos e citoplasma, cuja análise é subjetiva e depende da experiência do operador, o que acaba por ser uma limitação da técnica. Existe assim uma variabilidade intra e interlaboratorial que constitui o maior desafio no diagnóstico das doenças autoimunes. [30]

Têm sido descritos mais de 30 padrões e imunofluorescência, incluindo padrões nucleares e citoplasmáticos. Alguns deles raros. [30]

Tabela XII – Padrões característicos de fluorescência ANA. [30]

Padrão	Antigênio	Observações	
Nuclear			
Mosqueado	nRNP/Sm, Sm, Matriz Nuclear		DMTC, LES, Raynaud, ES, SS
Homogêneo	dsDNA, nucleossomas, histonas, cromatina		LES, Vasculite, Artrite juvenil idiopática
Fino Granular	SSA/Ro, SSB/La, Topo - I		LES, SS, ES, MI, DMTC
Dots Nucleares	Centrômeros A, B, C, F		ES, Raynaud
Nucleolar	Sci-70, PM-Scl, RNA polimerase, fibrilharina		ES, Raynaud, MI
Membrana Nuclear	Lâminas, gp210, p62		Hepatite autoimune (HAI), Vasculite, Trombocitopenia, LES e CBP
Aparelho Mitótico	Antigênios associados aos cromossomas, centríolos		Raynaud, ES, SS, CREST ou alguns síndromes crônicos pós-virais
Citoplasmático			
Granular	Jo-1, AMA, lisossomas, Aparelho de Golgi		MI, DM, CBP, Doença intersticial pulmonar
Filamentoso	Actina (ASMA), vimentina, tropomiosina		HAI, CBP, Anemia perniciosa, Miastenia Gravis e Doenças Reumáticas

Topo I, Topoisomerase; dsDNA, Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla; RNA, Ácido Ribonucleoproteico; AMA, Autoanticorpos anti mitocôndria; DMTC, Doença Mista Tecido Conectivo; LES, Lupus Eritematoso Sistêmico; ES, Esclerose Sistêmica; SS, Síndrome de Sjögren; MI, Miopatia Inflamatória; DM, Dermatomiosite; CBP, Cirrose Biliar Primária; HAI, Hepatite Auto imune; ASMA, Anticorpos anti músculo liso.

Os padrões característicos das células em Mitose, só aparecerão nessa fase do ciclo e a maior parte dos padrões associados a patologias ocorrem durante a Interfase.

Os padrões de ANA com mais significado clínico, são o homogéneo, fino granular, mosqueado, nucleolar e centrómero, associados ao dsDNA, histonas, SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, UI-RNP, Sm, Scl-70, PCNA, gp210, Sp100, CENP-B. [30]

Os resultados são expressos em diluição, mas para além do título (tanto mais sugestivo quanto mais elevado) é importante identificar o padrão de imunofluorescência, que varia conforme os Ags alvo do AAc. [29]

-Negativo

Quando na diluição do soro a 1/160 o núcleo das células HEp-2 não apresenta fluorescência ou exibe uma fraca marcação com padrão ininteligível ou apenas o citoplasma apresenta marcação, semelhante ao controlo negativo.

-Positivo

Quando a diluição do soro a 1/160, 1/320 e 1/640 é considerada positiva para Acs antinucleares se os núcleos das células HEp-2 apresentarem fluorescência superior à fluorescência do controlo negativo e com padrão ANA característico.

Quando as amostras são positivas atribui-se o título que é determinado pela maior diluição positiva e também é indicado o padrão de positividade. [29]

O resultado do screening por IFI vai orientar o estudo para a realização de ensaios mais específicos (ELISA, Imunoblotting), para determinar para que Ags os Acs são direcionados.

Na figura 34 estão representados os métodos específicos (Elisa e Imunoblotting), que permitirão a confirmação/ identificação do ou dos perfis de AAc pesquisados como já foi atrás referido.

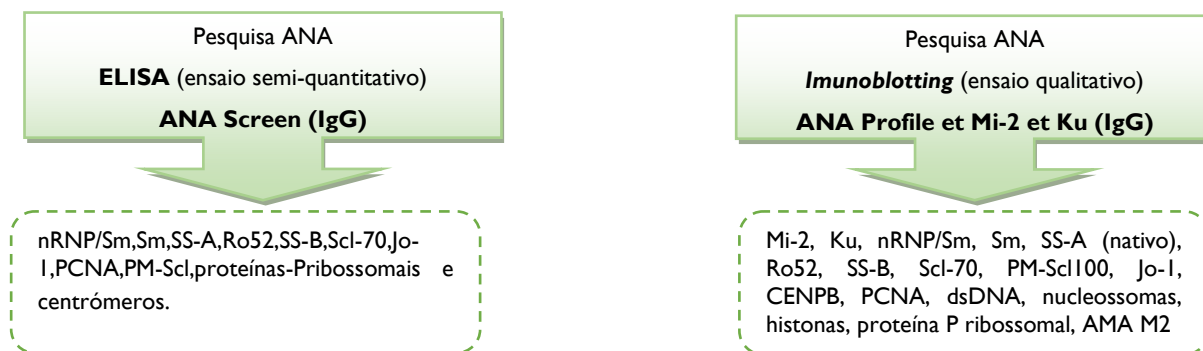


Figura 34 – Esquema representativo dos métodos específicos (Elisa e Imunoblotting) e respetivos antígenos.

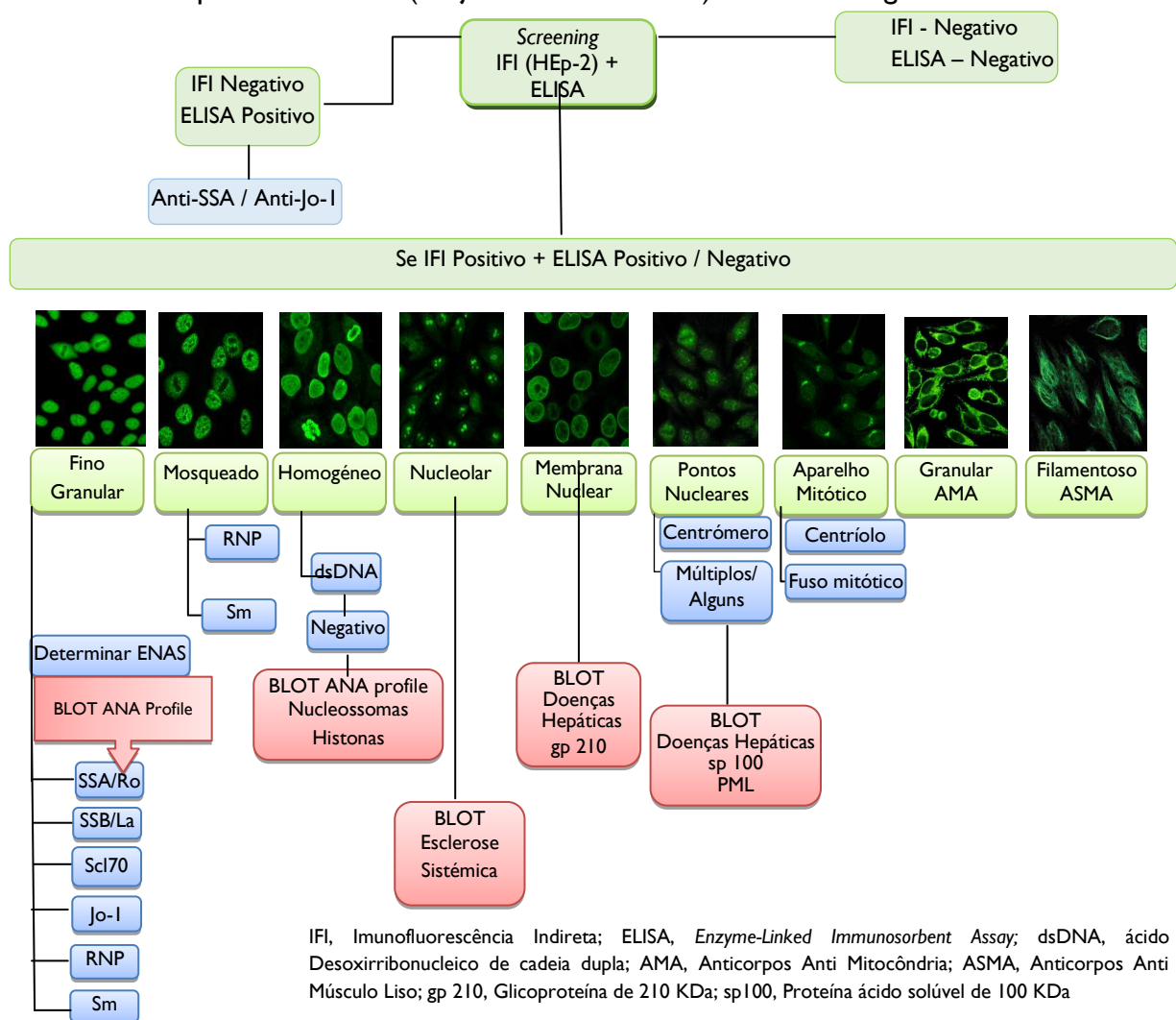
Fonte: SPC do CHMT

A detecção de ANA é um importante indicador de diagnóstico em muitas DAIs, em particular nas doenças reumáticas. A prevalência de ANA em doenças inflamatórias reumáticas é entre 20% e 100%. A Taxa mais baixa ocorre na artrite reumatoide (20% e 40%). O diagnóstico diferencial de Acs anti Acs do núcleo é indispensável para a identificação de doenças reumáticas individuais e sua diferenciação de outras DAIs (Ilustração 10). [23]

Presentemente ainda não existem técnicas uniformizadas e os resultados dependem das técnicas utilizadas e das preparações antigênicas usadas pelos fabricantes, que podem ter origens diferentes e serem produzidas por diversos métodos. [29]

Na quantificação destes AAs devemos ter em conta a variabilidade inter-série, intra-série e inter-lote. Nunca devemos esquecer esta variabilidade na interpretação das alterações de títulos observados num mesmo doente bem como na interpretação dos valores *borderline*. [23]

Na prática, para as técnicas IFI, tanto o título como os padrões de fluorescência podem variar de laboratório para laboratório (subjetividade na leitura) e com os reagentes utilizados.



IFI, Imunofluorescência Indireta; ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; dsDNA, ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla; AMA, Anticorpos Anti Mitocôndria; ASMA, Anticorpos Anti Músculo Liso; gp 210, Glicoproteína de 210 KDa; sp100, Proteína ácido solúvel de 100 KDa

Ilustração 10 – Algoritmo de orientação da determinação de ANA.
Fonte: SPC do CHMT

Os níveis de AAcS na maioria das patologias autoimunes não se correlaciona com a atividade da doença pelo que não há necessidade de se repetir a sua quantificação.

Outra situação semelhante é quando o resultado de pesquisa de AAcS é negativa. A sua detecção poderá eventualmente vir a ser requisitada de novo num contexto clínico evocador. [29]

Na requisição de ANA e na interpretação dos seus resultados devemos ter em conta:

- O conjunto de dados clínicos do doente, especialmente a orientação do diagnóstico;
- A informação atualizada sobre a doença e AAcS associados;
- As características das técnicas de detecção dos AAcS (sensibilidade, especificidade, valor preditivo). [29]

ii) Doenças Autoimunes – Casos Representativos

Uma DAI pode desenvolver-se em qualquer órgão ou tecido do nosso organismo. A lista de DAIs é extensa e não será descrita neste relatório, no entanto, irei apresentar alguns casos mais representativos.

Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)

O LES é uma doença sistémica, que incide particularmente em mulheres (9/1) jovens, com idades compreendidas entre os 15 e os 40 anos, onde são lesados muitos órgãos e/ ou sistemas (pele, articulações, rim e Sistema Nervoso Central), e por isso, o Colégio Americano de Reumatologia (ARC) decidiu que são necessárias lesões em pelo menos 4 sistemas para estabelecer o diagnóstico de lúpus (Figura 35). [29]

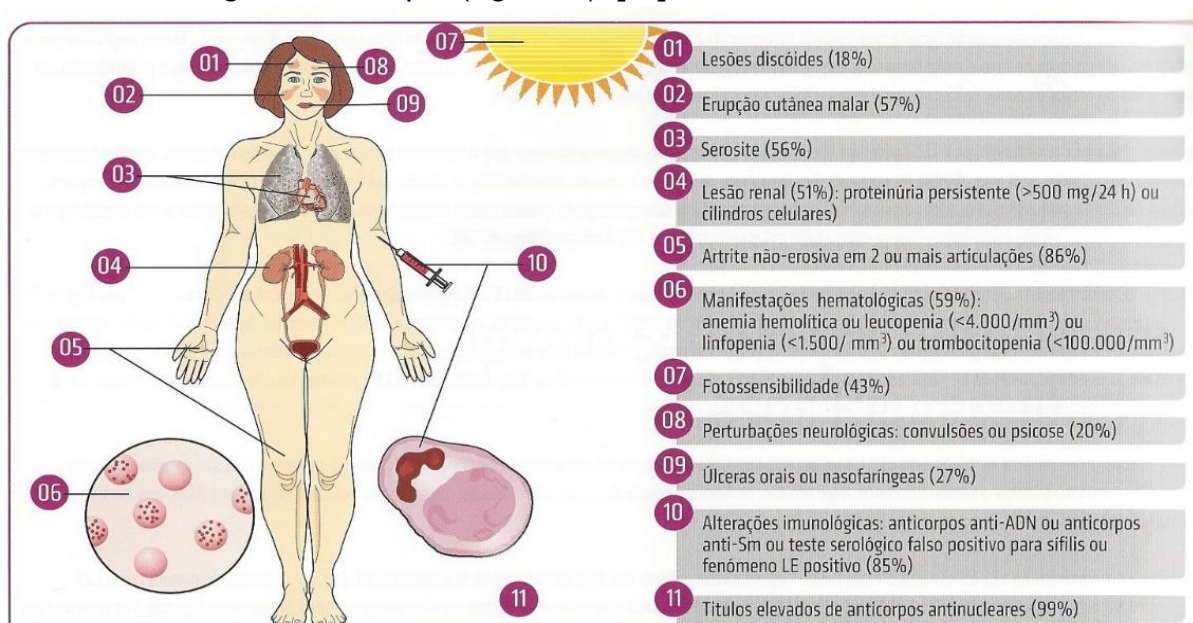


Figura 35 – As manifestações características de LES.

Fonte: [29]

O rim é um órgão importante que pode ser lesado, o que ocorre em 50% dos doentes. As provas do envolvimento renal são a presença de sangue e/ ou proteínas na urina. A análise química da urina ou através do microscópio pode revelar lesões renais. O envolvimento renal é bastante importante nos doentes com lúpus, uma vez que os rins são essenciais à vida. A doença renal é uma das manifestações mais graves do LES, pelo que, é obrigatório avaliar a função renal de todos os doentes lúpicos. [29]

A etiologia é desconhecida, mas na base da doença está envolvida uma desregulação imunológica, que poderá ter por causa fatores genéticos, hormonais e ambientais. As mulheres com LES têm muitos AAcs em circulação. [29]

Numa tentativa de clarificar o fenómeno LES foram detetados AAcs direcionados para vários componentes do núcleo da célula. Os AAcs são parte do diagnóstico de LES, especialmente os Acs anti dsDNA. O dsDNA, com uma especificidade de quase 100%, é considerado um dos critérios mais importantes para o diagnóstico de LES e o seu título está correlacionado com a atividade clínica da doença. [32,33]

Durante o curso da doença, imunocomplexos do DNA dupla fita e os Acs correspondentes são depositados nos capilares subcutâneos, rins e outros órgãos, nos quais causam lesões via ativação do sistema do complemento. [34,35]

Existem evidências crescentes de que o Ag alvo primário dos AAcs relevantes patologicamente não é o DNA “puro”, mas o DNA complexado com nucleossomas. [39]

Resultados de ANA positivos, mais as especificidades dos AAcs marcadores de LES (anti-dsDNA, anti-Sm ou anti-nucleossomas) são altamente sugestivos de LES. Se a eles adicionarmos 2 ou mais critérios do ACR, considera-se o diagnóstico definitivo. [29]

O contributo do laboratório de imunologia para o diagnóstico de LES é grande. O LES caracteriza-se pela existência de um elevado número de AAcs alguns dos quais são marcadores de doença (Tabela XIII). [29]

Tabela XIII – AAcs marcadores específicos de LES. [29]

Acs anti	Padrões IFI em células Hep2
dsDNA: 50 – 80% (CRITÉRIO ACR)	Homogéneo, mitoses positivas
Sm: 5-30% (CRITÉRIO ACR)	Mosqueado, mitoses negativas
Nucleossomas: 56-90%	Homogéneo, mitoses positivas
Ribosoma P: 10-20%	Citoplasma denso por veses com nucléolos positivos
PCNA: 5%	Nuclear pleomórfico

Acs, Anticorpos; dsDNA, Acido Desoxirribonucleico de cadeia dupla; Sm, Smith; PCNA, Autoanticorpos anti-ciclina; ACR, Colégio Americano de Reumatologia.

Há também AAcS que ajudam a diagnosticar alguns subtipos de LES. Lúpus Neonatal (SSA/ Ro) e Lúpus induzido por fármacos (histonas).

O lúpus neonatal ocorre na descendência de um pequeno número de mulheres com LES, por transmissão de Acs da mãe para o feto através da placenta. Esta forma da doença desaparece ao fim de 3-4 semanas após o nascimento, porque os Acs transmitidos são destruídos no sangue do recém-nascido. [29]

O lúpus induzido por fármacos afeta igualmente homens e mulheres e ocorre sem lesão dos rins ou sistema nervoso. Esta forma de lúpus cessa com o final da medicação. [29]

A monitorização do título de Acs anti dsDNA justifica-se, pois são um marcador da atividade da doença. A análise poderá ser requisitada todos os 3 a 6 meses ou mesmo antes em função do estado clínico, tendo sempre o cuidado de serem realizadas pelo mesmo método. [29]

Estes AAcS são quantificados por ELISA (anti dsDNA IgG), com uma sensibilidade e especificidade de 65-95% e 19-82%, respetivamente. [23]

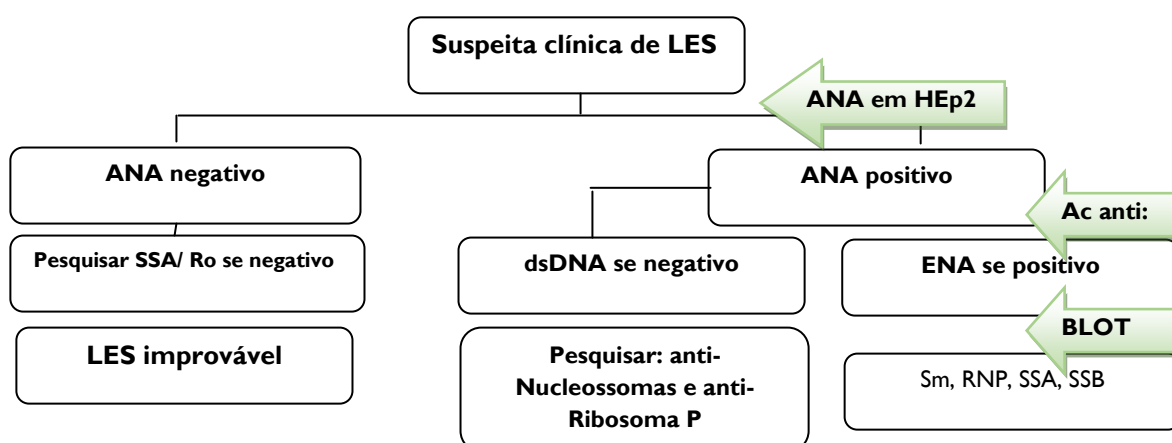


É importante ter em conta que:

- Os ANA são um teste sensível para LES, mas não são específicos;
- Não estão correlacionados com a atividade da doença (há exacerbações sem aumento dos níveis de ANA);
- Podem observar-se títulos elevados de ANA na ausência de doença.

Na presença de ANA negativos num doente com suspeita de LES, deve considerar-se a possibilidade de outro diagnóstico, avaliar se o doente está em remissão ou se existe insuficiência renal crónica. [29]

Na figura 36 está representando um esquema para orientação no diagnóstico de LES.



ANA, Anticorpos Antinucleares; LES, Lúpus Eritematoso Sistémico; dsDNA, Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla; ENA, Antígenos Extraíveis do Núcleo; Ac, Anticorpo; HEp2, Células do Carcinoma Laringeo Humano Tipo 2.

Figura 36 – Algoritmo de orientação do diagnóstico de LES. Fonte: Adaptado de [29]

A sobrevivência dos doentes com LES pode chegar aos 75% aos 20 anos de evolução, estando o pior prognóstico (50% de mortalidade em 10 anos) associado à patologia renal. [29]

Esclerose Sistêmica (ES)

A ES é uma DAI grave, cuja origem permanece ainda desconhecida. Caracteriza-se por lesões vasculares e intensa produção de fibrose no tecido cutâneo (esclerodermia) e em outros órgãos internos do corpo (tubo digestivo, coração, pulmão, entre outros). [36]

A doença começa muitas vezes por uma síndrome de Raynaud, doença dos pequenos vasos das extremidades (palidez digital e cianose em resposta ao frio e stress).

Trata-se de uma doença rara, com distribuição mundial e maior prevalência no sexo feminino, ocorrendo o pico da idade entre os 30 e os 50 anos. [29]

A etiologia da ES é desconhecida, nomeadamente, a sua relação com fatores hormonais. [29]

O diagnóstico diferencial de ES não é fácil. Antes do aparecimento dos sinais cutâneos (espessamento da pele) há que fazer o diagnóstico diferencial entre várias causas de fenómeno de Raynaud e ANA positivos. [29]

O fenómeno de Raynaud é muito frequente (>90% dos casos) e muitas vezes a primeira manifestação da doença. Pode surgir nas mãos e nos pés e é seguramente um sinal nas profundas alterações vasculares que surgem nesta doença e que também envolvem outros órgãos profundos, como os pulmões com hipertensão pulmonar e os rins com a crise renal da esclerodermia. [36,37]

A ES classifica-se em dois grandes tipos que apresentam manifestações clínicas, laboratoriais e um prognóstico diverso: ES com esclerodermia difusa e ES com esclerodermia limitada.

Os doentes com ES na forma difusa apresentam espessamento da pele do tronco, face e regiões proximais e distais das extremidades e têm um maior risco de desenvolverem mais precocemente manifestações viscerais graves, como a fibrose pulmonar intersticial.

Os doentes com ES na forma limitada apresentam espessamento cutâneo restrito a regiões distais, cotovelos, joelhos, face e pescoço. A chamada Síndrome de CREST com Calcinose, síndrome de Raynaud, Disfunção Esofágica, Esclerodactilia (pele fria, pálida, espessa e sem pelos nos dedos) e Telangiectasias (dilatação patológica persistente nos vasos sanguíneos superficiais) é uma subforma especial de ES, representa 20 – 30% dos doentes com esclerodermia e têm melhor prognóstico. [29,38]

O tecido conjuntivo dos pulmões, rins, esófago e coração está particularmente em risco. Hoje, sabe-se que o envolvimento dos pulmões é a principal causa de morte da ES. A taxa de sobrevivência de 10 anos é de 55%. [38]

Os critérios de diagnóstico para a ES, estabelecidos pelo ACR, em 1980, são:

Critério principal:

ES típica com alterações da pele próxima das articulações basais dos dedos.

Critérios secundários:

- esclerodactilia;
- cicatrizes distais ou perda de substância das partes moles dos dedos distais e/ ou dos pés;
- fibrose pulmonar basal bilateral.

O diagnóstico clínico pode ser estabelecido com uma certeza razoável caso se verifique o critério principal ou pelo menos dois critérios secundários. [39]

Apesar dos métodos de teste recentemente melhorados, os critérios não são, porém, muito sensíveis, em particular para um diagnóstico precoce em doentes que sofram da forma limitada da doença. [40]

Uma vez que a ES se manifesta de várias formas e em diferentes partes do corpo e pode levar até à paralisção, o diagnóstico torna-se difícil. [40] Verificou-se que fatores genéticos e processos autoimunes estimulam os AAcS anti receptor do trombócito, derivado do fator de crescimento PDGFR, estão definitivamente associados à doença. [41,42,43]

Laboratorialmente existe uma síndrome inflamatória normalmente pouco intensa. Dada a complexidade da doença, o diagnóstico serológico é particularmente importante. Em aproximadamente 90% dos casos de ES, são comuns ANA positivos e tem geralmente um padrão de fluorescência nucleolar. [29]

Os AAcS mais específicos de ES são os Acs anti-centrómero – CENP B (80%) e os anti-Scl 70 – topoisomerase I (30%), raramente coexistindo no mesmo paciente.

O Scl 70 é um produto de degradação ativo da topoisomerase I. Trata-se de uma enzima DNA Topoisomerase I, localizada no nucleoplasma e em particular e alta concentração nos nucléolos, cuja principal função é catalisar o DNA [30]. Outros AAcS podem ser observados, Acs anti: PM/ Scl100 (PM-1), Fibrilharina, NOR-90, RNA Polimerase I e Th/To, todos eles reconhecendo Acs nucleolares. As RNA Polimerase II e III são Acs localizados no nucleoplasma, com padrão de fluorescência granular. [29]

Na tabela XIV estão descritas as prevalências de AAcS anti Acs específicos de ES. [40,44,45,46]

Os Acs anti-fibrilharina são marcadores de diagnóstico e prognóstico da ES, possuindo também valor preditivo. [29]

Tabela XIV – Prevalências de AAcS anti Ags específicos de ES. [40,44,45,46]

Auto antígenos específicos de ES	Prevalência de autoanticorpos
Scl-70 (DNA Topoisomerase I)	Dependendo da atividade da evolução e do prognóstico 40-78% na ES (forma difusa) 5-15% na ES (forma limitada)
CENP A e CENP B (Proteína A do centrômero e proteína B do centrômero)	5-10% na ES (forma difusa) 80-95% na ES (forma limitada)
RNA Polimerase III (são específicos)	5-22% na ES (forma difusa)
Fibrilarina (U3-RNP)	5-10% na ES (forma difusa)
NOR90 (Região organizadora do nucléolo)	Raramente (<5% na ES)
Th/ To (complexo da proteína 7-2 RNP/7-2-RNA)	Raramente (<5% na ES)
PM-Scl (Complexo do Ag de 11-16 polipeptídeos, Ags principais PM Scl-100 e PM Scl-75)	10-20% na ES
Ku	Raramente (<5% na ES)

AAcS, Autoanticorpos; ES, Esclerose Sistêmica; Ag, Antígeno; Ags, Antígenos.

O título destes AAcS não varia com a evolução clínica, pelo que não é necessário repetir o seu doseamento.

A presença no soro de um indivíduo, de Acs anti – nucleolares específicos de ES (em título elevado) na ausência de sinais e sintomas específicos, deve alertar o médico para o risco de desenvolvimento da doença. Este deve também estar atento à ocorrência ocasional destes Acs (em título elevado) na ausência de outras manifestações clínicas autoimunes devendo nestes casos despistar a possibilidade de um tumor. [29]

Em suma, o LES e a ES são algumas das DAIs com maior incidência na mulher. Esta descoberta fornece uma pista acerca da existência de uma influência hormonal no SI, o que se correlaciona com a teoria do mosaico da autoimunidade, na qual, os fatores genéticos, ambientais e hormonais juntamente com um defeito imunitário são necessários para provocar DAIs.

A mulher tem um SI mais ativo e, hoje, sabe-se que os Estrogénios (Hormona Sexual Feminina) são responsáveis pelo SI da mulher ser mais eficaz que o do homem. Desta forma, está também mais propensa a desenvolver DAI.

Os Linfócitos possuem recetores para os estrogénios que, após ligarem-se, são internalizados e ativam mais eficazmente o SI, o que, em parte também explica a diminuição da incidência da DAI na menopausa. Nesta fase, embora, não curado, o LES, torna-se menos ativo, com menos exacerbações. [29]

Embora haja uma correlação genética, hormonal e medicamentosa, não há dúvidas de que o mecanismo despoletador é um fator ambiental. É este que determina a altura do aparecimento da doença, o tipo de doença e até as suas características clínicas. [29]

2.3 – Setor de Bioquímica

Este setor realiza a determinação de diversos parâmetros como iões, enzimas, metabolitos, técnicas electroforéticas de proteínas (proteinograma).

Tem como amostra mais frequente o soro obtido após centrifugação (3000 rpm durante 10 minutos à temperatura de 15°C) do sangue total, colhido para tubo com ativador da coagulação e gel de separação. Antes da centrifugação, os tubos permanecem em repouso durante cerca de 15 a 20 minutos, até à retração do coágulo.

O soro é então o resultado da centrifugação do sangue total sem os fatores de coagulação, como a fibrina.

Mas também realiza determinações em urina, no LCR, no sangue total, e ainda em outros fluidos biológicos como o líquido ascítico e o líquido pleural.

A maioria das determinações bioquímicas é realizada no Unicel Dx C 800.

As atividades desenvolvidas neste setor encontram-se resumidas na tabela XV.

Tabela XV – Equipamentos do setor de Bioquímica com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respetivos valores de referência.

Equipamentos Bioquímica	Método	Parâmetros	Valores de Referência
SYNCHRON Dx C®800	Potenciometria indireta, fotometria (colorimetria e turbidimetria)	Ácido Úrico	F 2.3-6-6 mg/dL M 4.4-7.6 mg/dL
		Albumina	A 3,5-4,8 g-/dL
		ALP	A 38-126 IU/L
		ALT	F 17-63 U/L M 14-54 U/L
		Amilase	A 28-100 U/L
		AST	A 15-41 U/L
		Bilirrubina total	A 0,30-1,20
		Cálcio	A 2.2-2.6 mmol/L
		CK	F 26-140 IU/L M 38-75 IU/L
		Cloro	A 98-107 mmol/L
		Colesterol HDL	A 0-100 mg/dL
		Colesterol Total	A 0-190 mg/dL
		Creatinina	F 0,4-1,0 mg/dL M 0,7-1,2 mg/dL
		Ferro	F 50.0-170.0 µg/dL M 65.0-175.0 µg/dL
		Fósforo	A 0.8-1.6 mmol/L
		GGT	A 7-64 IU/L
		Glicose	A 74-106 mg/dL
LDH	A 0-248 IU/L		

Tabela XV – continuação

SYNCHRON Dx^C800	Potenciometria indireta, fotometria (colorimetria e turbidimetria)	Lipase	A 22-51 U/L
		Potássio	A 3,5-5,1 mmol/L
		Magnésio	A 1.6-2.5 mg/dL
		Sódio	A 136-144 mmol/L
		Proteínas totais	A 6.4-8.3 g/dL
		Triglicéridos	A 70-150 mg/dL
		Ureia	A 11-50 mg/dL
		Bilirrubina direta	A 0.00-0.20 mg/dL
		PCR	A 0.00-0.75 mg/dL
		Carbamazepina*	A 4-12 µg/mL
		Digoxina*	A 0.8-2 ng/mL
		Fenitoína*	A 10-20 µg/ml
		Lítio*	NA
		Teofilina*	A 10-20 µg/mL
		Ácido Valpróico	A 50-100 µg/mL
		Acetaminofeno*	A 10-30 µg/mL (terapêutico)
		Álcool etílico*	NA
		CKMB*	A < 24 U/L
ADA*	A 4.8-23.1 U/L		
Colinesterase*	F 4.62-11.5 kU/L M 3.93-10.8 kU/L		
Aution Max AX42-80	Refletância, índice de refração, dispersão de luz	Urina Tipo II	
		Densidade	A 1.010-1.025
		Cor	-----
		Turvação	-----
		Glicose	A 0-30 mg/dL
		Proteínas	A 0-10 mg/dL
		pH	A 5-8
		Hemoglobina	A 0-0.03 mg/dL
		Corpos cetônicos	A 0-5 mg/dL
		Urobilinogênio	A 0-0.2 mg/dL
		Nitritos	-----
		Leucócitos	A 0-25 /µL
		Bilirrubina	A 0-0.2 mg/dL

A- Ambos; F-Feminino; M- Masculino; ALP- Fosfatase Alcalina; ALT- Alanina Aminotransferase; AST- Aspartato Aminotransferase; CK- Creatina Cinase; GGT- Gama Glutamil Transferase; LDH- Lactato Desidrogenase; PCR- Proteína C Reativa; CK MB - Creatina Cinase, MB; ADA- Adenosina Desaminase; NA - Não Aplicável.

Fonte: SPC do CHMT

2.4 – Setor de Hematologia

O setor de Hematologia para além de auxiliar no diagnóstico, como todas as áreas analíticas de um SPC, desempenha um papel fundamental na avaliação da ação da terapêutica instituída. Foi um dos setores que mais prosperou com o avanço da tecnologia, em que provas como a contagem de células, a determinação da velocidade de sedimentação e as provas de coagulação passaram a ser executadas em equipamentos automáticos, o que veio permitir a transmissão de resultados num curto espaço de tempo, fundamental na rotina diária de um Hospital, para auxiliar a clínica na seleção da melhor opção para o doente.

As atividades desenvolvidas neste setor encontram-se resumidas na tabela XVI.

A amostra utilizada para a determinação da maioria dos parâmetros é de sangue total, colhida em tubo com o anticoagulante EDTA.

Para as provas de coagulação, a amostra utilizada é plasma com citrato de sódio.

O exame mais frequentemente pedido é o Hemograma completo, que permite fazer uma análise quantitativa e qualitativa dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

Tabela XVI – Equipamentos do setor de Hematologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respetivos valores de referência.

Equipamentos Hematologia	Método	Parâmetros	Valores de Referência
Sysmex XE-2100 Sysmex XT-1800i	Citometria de fluxo, impedância, SLS-hemoglobina	Hemograma	
		Eritrócitos	M 4.5-5.5 $10^{12}/L$ F 3.8-4.8 $10^{12}/L$
		Leucócitos	A 4.0-10.0 $10^9/L$
		Neutrófilos	A 1.5-7.0 $10^9/L$
		Linfócitos	A 1.0-3.7 $10^9/L$
		Monócitos	A 0.0-0.7 $10^9/L$
		Eosinófilos	A 0.0-0.4 $10^9/L$
		Basófilos	A 1.0-2.0 %
		Hemoglobina	M 13.0-17.0 g/dL F 12.0-15.0 g/dL
		Hematócrito	M 40.0-50.0 % F 36.0-46.0 %
		VCM	A 80.0-100.0 fL
		HCM	A 27.0-32.0 pg
		CHCM (cálculo)	A 32.0-35.0 g/dL
		RDW	A 11.6-14.0 %
		Plaquetas	A 150-400 $10^9/L$
		VPM	A 8.2-9.7 fL
		PDW	A 9.0-17.0 %
Plaquetócrito	A 0.17-30.0 %		
Reticulócitos	A 50-100 $10^9/L$		

Tabela XVI – Continuação

STA Compact Max (x2)	Imunoturbidimetria	TP	A 9.6-14.4 seg
		INR	A 0.80-1.20
		aPTT	A 25.4-34.3 seg
		D-Dímeros	A 0-500 µg/L
		Fibrinogénio	A 2.38-4.98 g/L
		Tempo Trombina	A 0-21 seg
		Antitrombina III	A 80-130%
		F VW	A 60-150%
		Fator VIII	A 50-150%
		Proteína S livre	F 54-124% M 74-146%
		Proteína C func.	A 70-130%
		Anticoagulante lúpico (ratio)	A 0-1.2
Test I THL	Fotometria capilar de fluxo (análise cinética)	Velocidade de Sedimentação	F (51) 4-14 mm/h M (58) 3-9 mm/h (50-60 anos)
VARIANT™ II Hemoglobin Testing System	Cromatografia de Alta Resolução (HPLC)	Doseamentos das frações de Hemoglobina (A1C, F, A2)	HbA1C IFCC: 20-42 mmol/mol HbA1C DCCT: 4-6 %
HYDRASYS	Eletroforese em gel de agarose	Eletroforese de Hemoglobina	-----

A- Ambos; F- Feminino; M- Masculino; VCM- Volume Corpuscular Médio; HCM- Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW- Red Cell Distribution Width; VPM- Volume Plaquetar Médio; PDW- Platelets Distribution Width; TP- Tempo de Protrombina; INR- International Normalized Ratio; aPTT- Activated Partial Thromboplastin Time; F vW- Fator von Willebrand; HbA1C- Hemoglobina Glicada; HbF- Hemoglobina Fetal.

Fonte: SPC do CHMT

CONTROLO DE QUALIDADE DOS SETORES DE IMUNOLOGIA/ BIOQUIMICA E HEMATOLOGIA

Nos setores de Hematologia e Bioquímica/ Imunologia o CQI é efetuado diariamente como amostra de rotina, em conformidade com orientações das IT.SPC.020.00 e IT.SPC.029.00, respetivamente, no anexo XV.

Salienta-se que, no caso da Imunologia, e, em particular nos testes ELISA e IFI, o CQI é fornecido com o próprio KIT e efetuado em simultâneo com a série de amostras.

Para a maioria dos parâmetros analíticos destes setores, são realizados dois níveis de controlo diários. Nos casos de análises efetuadas semanalmente, os três níveis de controlo disponíveis são efetuados. Os critérios de aceitação dos controlos são baseados no intervalo de valores aceitável presente nas respetivas bulas e na interpretação das cartas de controlo (cartas de Levey-Jennings) de acordo com as Regras de Westgard. [15]

Periodicamente, por análise das cartas de controlo e sempre que é necessário, os responsáveis dos setores revêm o intervalo de referência aceitável para cada parâmetro. Os limites aceitáveis são $\pm 2DP$ (Desvio Padrão) da média. O CQI é efetuado também sempre que um novo lote de reagente é utilizado, depois de nova calibração, após manutenção do equipamento ou qualquer alteração nas suas condições de funcionamento.

Na AEQ, o setor de Hematologia, utiliza os programas do *Randox internationalquality assesement scheme* (RIQAS) e do INSA.

O setor de Bioquímica utiliza os programas de AEQ do RIQAS, LABQUALITY e do INSA.

O setor de Imunologia participa em três programas de AEQ, RIQAS, INSA e da Medizinische Labordiagnostika AG (EUROIMMUN). Na tabela XVII estão resumidos os vários programas de AEQ da Autoimunidade.

Tabela XVII – Programas de AEQ da Autoimunidade.

INSTITUTO	PARÂMETROS ANALÍTICOS	PERIODICIDADE
EUROIMMUN	ANA, ANCA e Triplo tecido	2x/ Ano (1 amostra)
INSA	Ac Anti-Tiroideus	2x/ Ano (1 amostra por ensaio)
	Doença Celíaca	
	FR e Ac Anti-CCP	
	Ac Fosfolipídicos	1x/ Ano (1 amostra)

EUROIMMUN, Medizinische Labordiagnostika AG; INSA, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.; RIQAS, *Randox internationalquality assesement scheme*; ANA, Anticorpos Anti-nucleares; ANCA, Anticorpo anti-citoplasma do Neutrófilo; Ac, Anticorpo; FR, Fator Reumatoide; CCP, Peptídeo cíclico citrulinado.

3. CONCLUSÃO

O Estágio em Análises Clínicas realizado no SPC do CHMT foi uma lição de vida, que me permitiu o aperfeiçoamento das técnicas e procedimentos teóricos adquiridos durante a frequência do Mestrado de Análises Clínicas.

Para além do contato direto com a rotina e fluxos de trabalho existentes no laboratório, permitiu também a tomada de consciência de que a correta execução dos procedimentos de realização das análises e a minimização dos erros ocorridos em qualquer fase da análise, torna os resultados do laboratório mais fidedignos e corretos, transmitindo elevados níveis de confiança não só aos médicos como aos próprios doentes.

É importante ter sempre em mente que a utilização dos exames contribui de forma eficaz na detecção de patologias e de diversos quadros clínicos, estando sempre em estreita colaboração com vários especialistas da área médica existentes no hospital.

Neste relatório procurei desenvolver e aprofundar dois dos setores do SPC, Microbiologia e Imunologia, em grande parte, pelo fascínio que sempre geraram em mim e não por os considerar de maior importância. O estágio veio confirmar que um setor não pode ser tratado isoladamente, todos eles estão interligados e funcionam como um todo, no contributo do laboratório para o diagnóstico clínico.

Em suma, a realização deste mestrado foi sem dúvida uma mais-valia para o enriquecimento pessoal e profissional, quer do ponto de vista de aluno quer de técnico superior de saúde. Contribuiu para a consolidação de conhecimentos que irão facilitar e melhorar o funcionamento, qualidade e desempenho laboratorial no futuro.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] <http://www.l.ipq.pt/pt/ipq/qualidade/sgq/Páginas/SGQ.aspx> (acedido a 01 de junho de 2016).
- [2] FONSECA, A.B. et al. – **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de Controlo de Infeção, 2004.
- [3] FORBES, B., SAHM, D., WEISSFELD, A. – **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 12TH Edition, 2007.
- [4] BENNER, E. – **Simple disposable method for quantitative cultures of urine**. Application Microbiology, 1970, vol.10, 409-412.
- [5] KONEMAN, E. et al. – **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5TH Edition, 2006.
- [6] www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8085859 (acedido a 02 de agosto de 2016).
- [7] <https://techlib.biomerieux.com> (acedido a 04 de julho de 2016).
- [8] FERREIRA, W.; SOUSA, J. *Microbiologia Volume II* Lisboa: Lidel, ed.,2000.
- [9] HEEJUNG, K., WAN, K., MYUNGSOOK, K. – **Evaluation of a Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous Detection of Glutamate Dehydrogenase and Toxin for the Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection**. Ann Lab Med, 2014, 34:235-239.
- [10] <http://www.cdc.gov> (acedido a 08 de julho de 2016).
- [11] <http://www.interchemical.com/products.asp?ID=39> (acedido a 08 de julho de 2016).
- [12] <http://www.oxid.com> (acedido a 01 de julho de 2016).
- [13] <http://www.ecdc.europa.eu> (acedido a 12 de agosto de 2016).
- [14] www.cepheid.com/us/cepheid-solutions (acedido a 12 de agosto de 2016).
- [15] COOPER, G. – **Quality Control In: Basic Lessons in Laboratory Quality Control**. Bio-Rad Laboratories, Inc. Quality Systems Division, 2008, pp 4-8.

[16] COOPER, G. – **Levey-Jennings Charts & Westgard Rules In: Basic Lessons in Laboratory Quality Control.** Bio-Rad Laboratories, Inc., Quality Systems Division, 2008, pp 23.

[17] PESCE, Amadeo J.; FRINGS, Christopher S.; GAULDIE, Jack – **Spectral Techniques In:** KAPLAN, Lawrence A.; PESCE, Amadeo J.; KAZMIERCZAK, Steven C. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation.* 4th Ed. Missouri: Mosby, 2003. ISBN: 0-323-01716-9. pp 94-105.

[18] KRICKA, L. et al – **Principles of Immunochemical Techniques In:** BURTIS, CARL A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp.162-169.

[19] DREES, Julia C.; WU, Alan H.B. – **Analytical Techniques In:** BISHOP, MICHAEL L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations.* 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 130-165.

[20] ORTON, Susan – **Immunoassays In** BISHOP, Michael L.; FODY, Edward P.; SCHOEFF, Larry E. *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations.* 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-0-7817-9045-1. pp. 185-190.

[21] www.beckmancoulter.com (acedido em 05 de agosto de 2016).

[22] www.phadia.com (acedido em 16 de agosto de 2016).

[23] www.euroimmun.com (acedido em 29 de julho de 2016).

[24] **ANA Diagnostic Using Indirect Immunofluorescence.** Euroimmun. Medizinische Labordiagnostika AG.

[25] ROITT, Ivan; BROSTOFF, Jonathan; MALE, David – **Imunologia.** 6ª Ed. São Paulo: Manole, 2003. ISBN: 85-204-1439-7. pp 419-421.

[26] KRICKA, L. et al – **Principles of Immunochemical Techniques In:** BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* 6th Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN: 978-0-7216-3865-2. pp 162-169.

- [27] BURMESTER, Gerd; PEZZUTTO, Antonio – **Imunologia – Texto e Atlas**. 1ª Ed. Lisboa: Lidel, 2005. ISBN: 972-757-329-0
- [28] NAIRN, Roderick; HELBERT, M. – **Immunology for Medical Students**. 2ª Ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007.
- [29] SHOENFELD, Yehuda; ABREU, Isabel; BRANCO, Jaime – **Doenças Autoimunes**. 1ª Ed. Estados Unidos da América: Bio-Rad Laboratories, 2008.
- [30] SOUSA, Maria José – **Os ANA no Diagnóstico Laboratorial das Doenças Autoimunes**. 1ª Ed. Lisboa: Centro de Medicina Laboratorial Dr. Germano de Sousa, 2009.
- [31] AROSA, Fernando A.; CARDOSO, Elsa M. e PACHECO, Francisco C. – **Fundamentos de Imunologia**. 1ª Ed. Lisboa: Lidel, 2007.
- [32] RADICE, A; SINICO, RA – **A new oligonucleotide-based ELISA for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies**. *Autoimmunity* 39 (2006) 113-119.
- [33] MAKOWSKI, GS; RAMSBY, ML – **Selective detection of autoimmune antibodies to single and double stranded DNA by enzyme immunoassay**. *Ann Clin Lab Sci* 33 (2003) 142-148.
- [34] HERRMANN, M; VOLL, R; KALDEN, VR – **Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus**. *Immunol Today* 21(2000) 424-426.
- [35] PARODI, A. et al. – **Antidouble-stranded DNA isotypes in lupus erythematosus patients with prevalent cutaneous presentation**. *Br J Dermatol* 147 (2002) 754-656.
- [36] TAMBORRINI, G; DISTLER, M; DISTLER, O. – **Systemic sclerosis**. *Med Monatsschr Pharm* 31 (2008) 162-170.
- [37] SUNDERKOTTER, C; RIEMECASTEN, G. – **Pathophysiology and clinical consequences of Raynaud's phenomenon related to systemic sclerosis**. *Rheumatology (Oxford)* 45 (2006) 33-35.
- [38] VARGA, J. – **Systemic sclerosis: an update**. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66 (2008) 198-202.
- [39] HUDSON, M. et al. – **Improving the sensitivity of the American College of Rheumatology classification criteria for systemic sclerosis**. *Clin Exp Rheumatol* 25 (2007) 754-757.

- [40] WALKER, JG et al. – **The development os systemic sclerosis classification criteria.** Clin Rheumatol 26 (2007) 1401-1409.
- [41] BARONI, SS et al. – **Stimulatory autoantibodies to the PGDF receptor in systemic sclerosis.** N. Engl J Med 354 (2006) 2667-2676.
- [42] VARGA, J.; ABRAHAM, D. – **Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder.** J Clin Invest 117 (2007) 557-567.
- [43] REVEILLE, JD. – **The genetic basis of autoantibody production.** Autoimmun Rev 5 (2006) 389-398.
- [44] ADMOU, B. et al. – **Autoantibodies in systemic sclerosis: clinical interest and diagnosis approach.** Ann Biol Clin (Paris) 67 (2009) 273-281.
- [45] HO, KT; REVEILLE, JD. – **The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma.** Arthritis Res Ther 5 (2003) 80-93.
- [46] AGGARWAL, R et al. – **Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis.** Arthritis Rheum 60 (2009) 1112-1118.

ANEXOS

ANEXO I- Corantes e respectivos tempos das três colorações utilizadas no Setor de Microbiologia, realizadas no equipamento automático – PolyStainer [2]

Corantes e respectivos tempos das três colorações utilizadas no Setor de Microbiologia, realizadas no equipamento automático – PolyStainer [2]

<u>Coloração de Gram – Programa 00</u>	<u>Coloração Ziehl-Neelsen Modificada (Kinyoun) – Programa 01</u>	<u>Coloração por Auramina – Programa 02</u>
Cristal Violeta – 1 min	Fucsina – 4 min	Auramina – 15 min
Água corrente – 1,5 min	Água corrente – 30 seg	Água corrente – 40 seg
Iodina – 1 min	Descorante ZN – 5 seg	Descorante ZN – 40 seg
Água corrente – 1 min	Água corrente – 30 seg	Água corrente – 30 seg
Descorante – 1 min	Azul de Metileno – 30 seg	Fucsina – 2 min
Água corrente – 1 min	Água corrente – 30 seg	Água corrente – 30 seg
Safranina – 1 min	Secagem – 3 min	Secagem – 3 min
Água corrente – 1 min		
Secagem – 1,5 min		

Min- minutos; Seg- segundos

ANEXO II- Composição dos meios de cultura BD BACTEC Aeróbio Plus/F e Anaeróbio Plus/F, utilizados num procedimento qualitativo para a cultura aeróbia e anaeróbia e isolamento de microrganismos (Bactérias e Leveduras) no sangue. [6]

Composição dos meios de cultura BD BACTEC Aeróbio Plus/F e Anaeróbio Plus/F, utilizados num procedimento qualitativo para a cultura aeróbia e anaeróbia e isolamento de microrganismos (Bactérias e Leveduras) no sangue. [6]

BD BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials e BACTEC Plus Anaerobic/F Culture Vials (Frascos de Cultura) Meio Líquido de Soja-Caseína Digerida

Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Os meios BD BACTEC Plus Aerobic/F e Plus Anaerobic/F (Aeróbio Plus/F e Anaeróbio Plus/F) são utilizados num procedimento qualitativo para a cultura aeróbia e anaeróbia e isolamento de microrganismos (bactérias e leveduras) do sangue. A utilização principal destes meios é aplicável a instrumentos da série fluorescente BD BACTEC.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A amostra a ser testada é inoculada dentro de um ou mais frascos, os quais são introduzidos dentro do instrumento da série fluorescente BACTEC, para incubação e leituras periódicas. Cada frasco contém um sensor químico que consegue detectar aumentos no CO₂ produzido pelo crescimento dos microrganismos. O sensor é monitorizado pelo instrumento a cada dez minutos relativamente ao aumento da respectiva fluorescência, proporcional à quantidade de CO₂ presente. Uma leitura positiva indica a presença presumida de microrganismos viáveis no frasco. A detecção está limitada aos microrganismos que crescerão num tipo de meio específico.

As resinas foram descritas para o tratamento de amostras de sangue antes e após da respectiva inoculação nos meios de cultura. As resinas foram incorporadas nos meios de cultura BACTEC para potenciar o isolamento de organismos sem exigir de um processamento especial.¹⁻³

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Se existirem microrganismos na amostra de teste inoculada dentro do frasco BACTEC, ocorrerá a produção de CO₂ quando os organismos metabolizarem os substratos presentes no frasco. Os aumentos na fluorescência do sensor do frasco provocados pelo aumento na quantidade de CO₂ são monitorizados pelo instrumento da série fluorescente BACTEC. A análise da velocidade e da quantificação do aumento do CO₂ permite ao instrumento da série fluorescente da marca BACTEC determinar se a leitura do frasco é positiva, ou seja, se a amostra testada contém organismos viáveis.

REAGENTES

Antes do processamento, os frascos de cultura BACTEC contêm os seguintes ingredientes reactivos:

Lista de ingredientes	BACTEC Plus Aerobic/F	BACTEC Plus Anaerobic/F
Água processada	30 mL*	25 mL
	p/v	p/v
Meio líquido de soja-caseína digerida	3,0%	3,0%
Extracto de levedura	0,25%	0,4%
Tecido animal digerido	—	0,05%
Aminoácidos	0,05%	0,25%
Açúcar	—	0,25%
Citrato de sódio	—	0,02%
Polianetolsulfonato de sódio (SPS)	0,05%	0,05%
Vitaminas	0,025%	0,0006%
Antioxidantes/Redutores	0,005%	0,16%
Resina Adsorvente Não iónica	16,0%	16,0%
Resina de Permuta Catiónica	1,0%	1,0%

Todos os meios BACTEC são distribuídos com CO₂ adicionado. Os meios anaeróbios são previamente reduzidos e distribuídos com CO₂ e N₂.

*O volume do meio no frasco BACTEC Plus Aerobic/F foi aumentado de 25 mL a 30 mL.

Advertências e Precauções:

Os frascos de cultura preparados destinam-se a ser utilizados no diagnóstico *in vitro*.

Este produto contém borracha natural seca.

Podem existir microrganismos patogénicos nas amostras clínicas, incluindo os vírus da hepatite e o vírus da imunodeficiência humana. Na manipulação de todos os itens contaminados com sangue e outros líquidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções Padrão"⁴⁻⁷ e as directrizes da instituição.

Antes de ser utilizado, cada frasco deve ser examinado relativamente a sinais de contaminação, tais como turvação, abaulamento ou depressão do septo, ou fugas. NÃO UTILIZE nenhum frasco que apresente sinais de contaminação. Um frasco contaminado pode conter uma pressão positiva. Se for

ANEXO III- Norma DGS 019/ 2014| Diagnóstico da Infecção por *Clostridium difficile* nos Hospitais, Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados e na Comunidade

NÚMERO: 19/2014
DATA: 19/12/2014
ATUALIZAÇÃO: 24/03/2015

ASSUNTO: Diagnóstico da Infecção por *Clostridium difficile* nos Hospitais, Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados e na Comunidade

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium difficile*, diagnóstico

PARA: Hospitais e outras Unidades de Saúde

CONTACTOS: Departamento da Qualidade na Saúde (dqs@dgs.pt)

Nos termos da alínea a) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, de 26 de Janeiro, a Direção-Geral da Saúde, por proposta conjunta do Departamento da Qualidade na Saúde, do Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianas e da Ordem dos Médicos, emite a seguinte:

NORMA

1. Nos doentes internados, a requisição de estudo microbiológico de fezes para diagnóstico de infeção por *Clostridium difficile* deve ser efetuada nos doentes com diarreia, internados há mais de 72h, e nos doentes admitidos com diarreia, que não pode ser atribuída de forma clara a uma patologia subjacente (ex: colite inflamatória) ou a uma terapêutica (alimentação entérica, laxantes) ⁽¹⁻⁴⁾ (Categoria IB).
2. Na comunidade, a requisição de estudo microbiológico de fezes para diagnóstico de infeção por *Clostridium difficile* deve ser efetuada em todos os doentes com diarreia, com idade igual ou superior a 65 anos ^(1,3) (Categoria IB).
3. A pesquisa de *Clostridium difficile* deve ser efetuada apenas em amostras diarreicas ⁽¹⁻⁶⁾ (Categoria IB):
 - a) Não devem ser requisitados testes em utentes assintomáticos;
 - b) A colheita de fezes para exame microbiológico para diagnóstico de infeção por *Clostridium difficile* deve ser efetuada, precocemente, após o início da diarreia;
 - c) Na impossibilidade de envio imediato ao laboratório de referência, as amostras diarreicas são conservadas entre 2 a 8°C ^(2,6) até à altura da sua entrega que não deve ultrapassar as 24h/48h;
 - d) No laboratório a amostra deve ser refrigerada caso não possa ser processada dentro de duas horas após a receção;
 - e) As outras causas de diarreia devem ser excluídas antes de se fazer o diagnóstico de infeção por *Clostridium difficile* (Grau de Recomendação II);
 - f) Não devendo os testes ser repetidos por rotina, se o primeiro resultado for negativo e existe uma forte suspeita clínica, deve ser efetuada nova colheita 24 horas depois;

- g) Nos doentes, com identificação prévia de toxina positiva para *Clostridium difficile*, só devem repetir-se os testes se houver suspeita de recidiva e tiverem sido excluídas outras possíveis causas para a diarreia (Categoria IB).

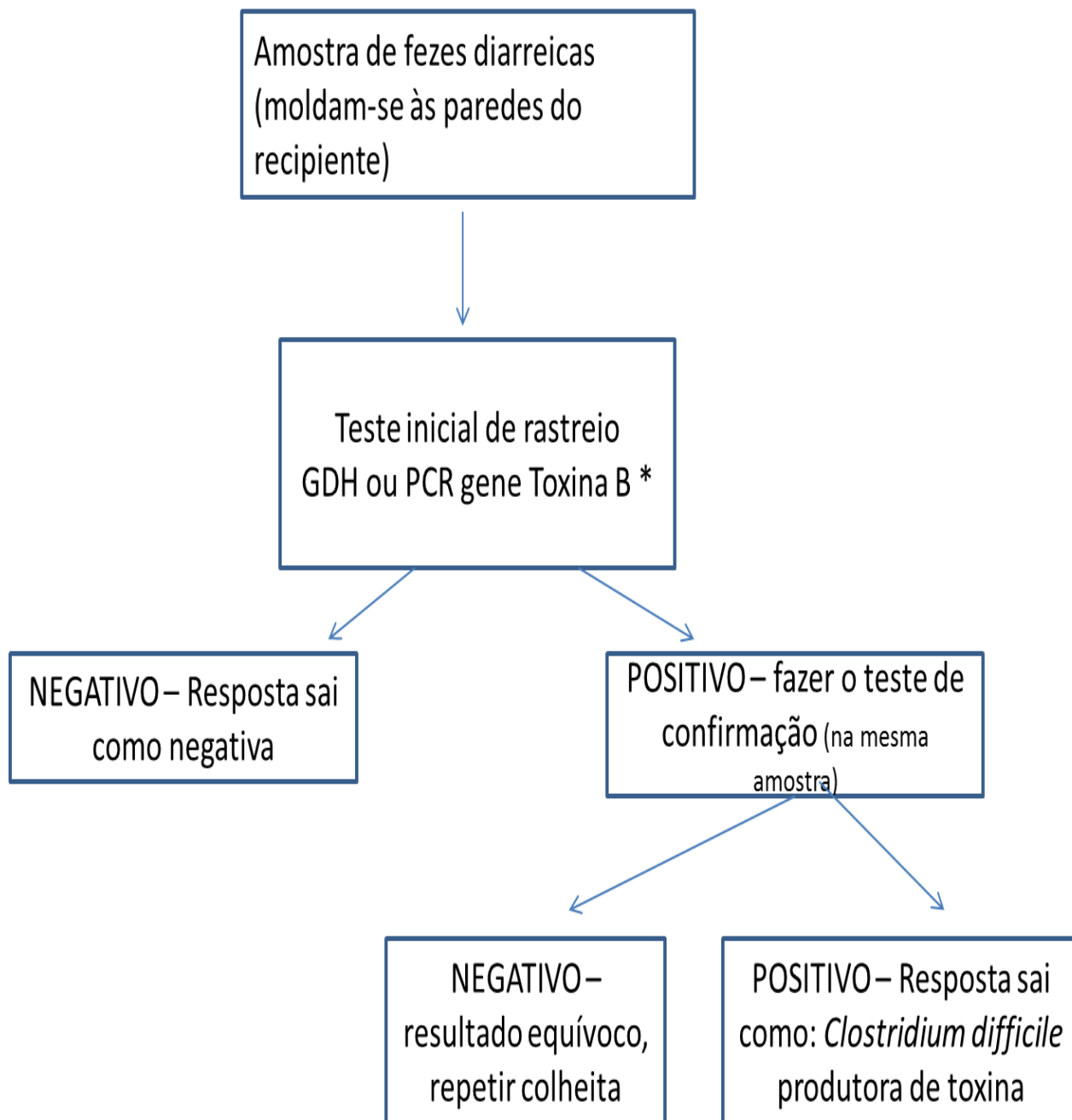
4. Seleção de testes laboratoriais:

- a) Nenhum dos testes disponíveis deve ser usado isoladamente para o diagnóstico de infeção por *Clostridium difficile* ^(4-6; 9) (Categoria IA);
- b) O teste para pesquisa das toxinas é clinicamente importante porque permite obter resultados rapidamente, mas o seu valor é limitado pela sua reduzida sensibilidade. A pesquisa de toxinas não deve ser usada como único método para diagnóstico da infeção ^(4-6; 9) (Categoria IB);
- c) Devem ser efetuados pelo menos dois testes conforme proposto pela *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* ⁽⁴⁾ (Categoria IB) (Anexo II).

5. Qualquer exceção à Norma é fundamentada clinicamente, com registo no processo clínico.

6. O algoritmo clínico

Diagnóstico da infeção por *Clostridium difficile*



* Existem atualmente no mercado testes combinados que permitem fazer o rastreio e a confirmação ao mesmo tempo.

7. O instrumento de auditoria clínica

Instrumento de Auditoria Clínica				
Norma "Diagnóstico da infeção por <i>Clostridium difficile</i> nos Hospitais, Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados e na Comunidade"				
Unidade: _____				
Data: ___/___/___		Equipa auditora: _____		
1: Unidades de internamento				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que no internamento, a requisição de estudo microbiológico de fezes para diagnóstico de infeção por <i>Clostridium difficile</i> é efetuada no doente com diarreia, internado há mais de 72h, e no doente admitido com diarreia, que não pode ser atribuída de forma clara a uma patologia subjacente (ex: colite inflamatória) ou a uma terapêutica (alimentação entérica, laxantes)				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
2: Comunidade				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que na comunidade a requisição de estudo microbiológico de fezes para diagnóstico de infeção por <i>Clostridium difficile</i> é efetuada no doente com diarreia, com idade igual ou superior a 65 anos				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
3: Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i>				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que a pesquisa de <i>Clostridium difficile</i> é efetuada apenas em amostras diarreicas				
Existe evidência de que não são requisitados testes em utentes assintomáticos				
Existe evidência de que a colheita de fezes para exame microbiológico para diagnóstico de infeção por <i>Clostridium difficile</i> é efetuada, precocemente, após o início da diarreia				
Existe evidência de que outras causas de diarreia são excluídas da pesquisa, antes de se fazer o diagnóstico de infeção por <i>Clostridium difficile</i>				
Existe evidência de que se o primeiro resultado for negativo e existe uma forte suspeita clínica, é efetuada nova amostra 24 horas depois				
Existe evidência de que no doente, com identificação prévia de toxina positiva para <i>Clostridium difficile</i> , só são repetidos os testes se houver suspeita de recidiva e tiverem sido excluídas outras possíveis causas para a diarreia				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
3: Seleção de Testes Laboratoriais				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que nenhum dos testes disponíveis é usado isoladamente para o diagnóstico de infeção por <i>Clostridium difficile</i>				
Existe evidência de que a pesquisa de toxinas não é usada como único método para diagnóstico da infeção				
Existe evidência de que são efetuados pelo menos dois testes conforme proposto pela <i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			

Avaliação de cada padrão: $x = \frac{\text{Total de respostas SIM}}{\text{Total de respostas aplicáveis}} \times 100 = (\text{IQ}) \text{ de } \dots\%$

8. A presente Norma, atualizada com os contributos científicos recebidos durante a discussão pública, revoga a versão atualizada de 19/12/2014 e será atualizada sempre que a evolução da evidência científica assim o determine.
9. O texto de apoio seguinte orienta e fundamenta a implementação da presente Norma.



Francisco George
Diretor-Geral da Saúde

TEXTO DE APOIO

Conceito, definições e orientações

A. Na presente Norma foram utilizadas as categorias do CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*)/HICPAC (*Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee*) indicativas da força e qualidade da evidência da recomendação:

- 1) Categoria IA: fortemente recomendado para implementação e de grande evidência baseada em estudos experimentais bem conduzidos, clínicos, ou estudos epidemiológicos;
- 2) Categoria IB: fortemente recomendado para implementação, baseada na racionalidade e evidência sugestiva de alguns estudos experimentais, clínicos, ou estudos epidemiológicos;
- 3) Categoria IC: recomendação sugerida por normas ou recomendações de outras federações e associações;
- 4) Categoria II: recomendação sugerida para implementação baseada na clínica sugestiva ou estudos epidemiológicos, ou uma forte fundamentação teórica.

B. Esta norma tem como objetivo promover um diagnóstico laboratorial mais efetivo e consistente a nível nacional a fim de permitir um diagnóstico rápido permitindo a iniciação precoce da terapêutica e a adoção de medidas de prevenção da transmissão cruzada.

C. Colheita, transporte e conservação das amostras de fezes ⁽⁴⁻⁶⁾:

- 1) As fezes dos utentes com diarreia devem ser colhidas o mais depressa possível a fim de permitir uma melhor gestão dos recursos de isolamento. Assim, não se recomenda aguardar por três episódios de diarreia antes do pedido de análise porque irá atrasar a confirmação da presença de infeção por *Clostridium difficile*:
 - a) Usar técnica asséptica na colheita (para segurança do profissional);
 - b) Utilizar um contentor limpo e seco que fique bem selado (para impedir fugas) e colocar o mesmo num saco de plástico para transporte;
 - c) No caso do utente acamado, a amostra pode ser colhida para uma arrastadeira limpa e seca e depois transferida para o contentor. A amostra será inapropriada se estiver contaminada com sabão, detergente ou desinfetantes;
 - d) Sempre que possível, colher a amostra antes da administração de antibióticos;
 - e) A amostra deve ter um volume mínimo de 1-2ml;
 - f) Não devem ser colhidas amostras de fezes moldadas. Nas situações de infeção por *Clostridium difficile* "silenciosa" tais como ileus, megacolon tóxico ou colite pseudomembranosa sem diarreia, será necessário recorrer a outros procedimentos diagnósticos tais como colonoscopia, podendo ser necessário referência para a Gastroenterologia. Muito ocasionalmente, é possível que um utente com ileus tenha

fezes moldadas que devem ser testadas para a pesquisa de toxina de *C. difficile*, no entanto o laboratório deve ser avisado desta situação.

- 2) A amostra deve ser transportada e processada com a maior brevidade possível. Sendo a toxina muito instável, degradando-se à temperatura ambiente, o envio tardio poderá dar origem a falsos negativos. Caso se preveja atraso no transporte, a amostra deve ser refrigerada^(5,6) (2-8°C);
 - 3) No laboratório a amostra deve ser refrigerada caso não possa ser processada dentro de duas horas após a receção^(5,6);
 - 4) Nas situações de surto e nas formas graves da doença (ileus, colite pseudomembranosa, megacolon) as amostras de fezes devem ser conservadas a -20°C durante 3 meses a fim de possibilitar estudos epidemiológicos mais específicos. Para estudos epidemiológicos em situações de surto devem ser enviadas amostras de fezes de pelo menos dez utentes^(5,6).
- D. Os métodos para o diagnóstico laboratorial de infeção por *Clostridium difficile* podem ser de 3 tipos: deteção de glutamato-desidrogenase; deteção de toxinas do *Clostridium difficile* e produtos bacterianos (toxinas, glutamato desidrogenase); deteção de genes e cultura do microrganismo^(4-6,9):
- 1) Deteção de produtos bacterianos:
 - a) Testes de deteção de antigénios: a pesquisa de GDH tem um elevado valor preditivo negativo pelo que é um bom teste de rastreio;
 - b) Testes de pesquisa de toxinas: largamente utilizados até há pouco tempo como método único, são muito específicos mas têm uma baixa sensibilidade, pelo que devem integrar os EIA para toxinas A, B ou A e B. São rápidos, de execução relativamente fácil não tendo todavia a mesma sensibilidade que os restantes métodos;
 - c) Teste de citotoxicidade deteta apenas a toxina B. Trata-se de um método complexo, caro e demorado. Considerado o método padrão, mostrou ser menos sensível que o PCR ou a cultura toxigénica.
 - 2) Testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs): O PCR em tempo real é um teste rápido, sensível e específico e poderá vir a ser utilizado como teste inicial ou de confirmação. Existem outros métodos (LAMP – amplificação térmica) ainda não comercializados em Portugal. Podem identificar genes das toxinas, gene do GDH ou o 16S RNA. No nosso país é utilizado o teste que pesquisa genes de toxinas. Nos EUA, na atualidade, surgem propostas de se fazer o PCR como método único, argumentando com a rapidez. Contudo, este método não identifica a produção ativa de toxina e, por outro lado, não está disponível em muitos dos laboratórios do país;
 - 3) Exame cultural de fezes: apesar de não ser prático pelos recursos exigíveis e pela demora na obtenção de resultados, a sensibilidade e especificidade do exame bacteriológico convencional e comprovação por isolamento de estirpe toxigénica de *C. difficile* (cultura toxigénica), permite a sua utilização como padrão para comparação de resultados com outros testes. A cultura de fezes confirma a presença de *Clostridium difficile* mas como avalia a produção de toxina *in vitro*, não

garante tratar-se de uma estirpe que esteja a produzir toxina *in vivo*. É contudo essencial para estudos epidemiológicos, como por exemplo, em situações de surto;

- 4) O diagnóstico precoce é essencial para prevenção e controlo da infeção nas unidades de cuidados de saúde. Em situações de suspeita de infeção por *Clostridium difficile*, o início de medidas de prevenção e controlo da transmissão cruzada desta infeção e de tratamento dirigido não devem ser adiados até conhecimento do resultado dos testes laboratoriais. A seleção dos testes deve ter em conta o tempo de resposta. É importante que o teste esteja disponível durante as 24 horas do dia e durante o fim de semana.

Fundamentação

- A. A incidência e a severidade da Infeção por *Clostridium difficile* têm vindo a aumentar nos últimos anos. O diagnóstico é baseado numa combinação de sinais e sintomas e confirmado pela evidência laboratorial da presença duma estirpe produtora de toxinas ⁽¹⁻⁴⁾.
- B. As grandes diferenças nas taxas de infeção reportadas nos diversos países europeus têm sido atribuídas a diferenças no grau de suspeição e consequente frequência de requisição de exames laboratoriais confirmatórios, variabilidade na capacidade laboratorial para seleção dos métodos mais adequados, a disponibilidades dos testes nos períodos noturnos e ao fim de semana e a consequente rapidez de resposta ^(4, 8, 9).
- C. No recente inquérito realizado pelo PPCIRA junto dos laboratórios hospitalares, verifica-se que em cerca de metade dos hospitais, a pesquisa para *Clostridium difficile* é efetuada apenas quando solicitada pelo médico assistente. Por outro lado, um número apreciável de laboratórios utiliza apenas um teste diagnóstico e, em muitos deles, o teste não está disponível no período noturno e no fim de semana (dados não publicados). Um diagnóstico rápido e rigoroso é essencial.
- D. A seleção dos métodos laboratoriais tem repercussão na decisão clínica de tratamento, na utilização dos recursos laboratoriais, nas práticas de controlo de infeção e na vigilância epidemiológica da infeção (cálculo das taxas) ⁽⁷⁻⁹⁾.

Avaliação

- A. A avaliação da implementação da presente Norma é contínua, executada a nível local, regional e nacional, através de processos de auditoria interna e externa.
- B. A parametrização dos sistemas de informação para a monitorização e avaliação da implementação e impacte da presente Norma é da responsabilidade das administrações regionais de saúde e dos dirigentes máximos das unidades prestadoras de cuidados de saúde.
- C. A efetividade da implementação da presente Norma nos cuidados de saúde primários, nos cuidados hospitalares e nas unidades de internamento de cuidados continuados integrados e a emissão de diretivas e instruções para o seu cumprimento é da responsabilidade dos conselhos clínicos dos

agrupamentos de centros de saúde, das direções clínicas dos hospitais e dos diretores das unidades de internamento de cuidados continuados integrados.

D. A implementação da presente Norma pode ser monitorizada e avaliada através dos seguintes indicadores:

- 1) N.º de testes requisitados para diagnóstico de infeção por *C. difficile* no total de coproculturas requisitadas em amostras diarreicas;
- 2) N.º de testes requisitados para diagnóstico de infeção por *C. difficile* em fezes não diarreicas no total de testes requisitados;
- 3) N.º de testes positivos por mil dias de internamento.

Comité Científico

- A. A proposta da presente Norma foi elaborada no âmbito do Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde, do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos e do Conselho para Auditoria e Qualidade da Ordem dos Médicos, através dos seus Colégios de Especialidade, ao abrigo do protocolo existente entre a Direção-Geral da Saúde e a Ordem dos Médicos.
- B. A elaboração da proposta da presente Norma foi efetuada por Elaine Pina, António Sousa Uva (coordenação científica), Goreti Silva, Luís Marques Lito e Mónica Oleastro.
- C. Todos os peritos envolvidos na elaboração da presente Norma cumpriram o determinado pelo Decreto-Lei n.º 14/2014 de 22 de janeiro, no que se refere à declaração de inexistência de incompatibilidades.
- D. A avaliação científica do conteúdo final da presente Norma foi efetuada no âmbito do Departamento da Qualidade na Saúde.

Coordenação Executiva

Na elaboração da presente Norma a coordenação executiva foi assegurada por Cristina Martins d'Arrábida, do Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde.

Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas

Pelo Despacho n.º 7584/2012, do Secretário de Estado Adjunto do Ministro da Saúde, de 23 de maio, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 107, de 1 de junho de 2012, a Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas tem como missão a validação científica do conteúdo das Normas Clínicas emitidas pela Direção-Geral da Saúde. Nesta Comissão, a representação do Departamento da Qualidade na Saúde é assegurada por Henrique Luz Rodrigues.

Siglas/Acrónimos

Siglas/Acrónimos	Designação
EIA	Teste imunoenzimático
GDH	Glutamato desidrogenase
LAMP	NAAT com amplificação isotérmica
NAAT	Amplificação de Ácidos Nucleicos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPCIRA	Programa de prevenção e controlo das infeções e resistências aos antimicrobianos

Referências Bibliográficas

1. *Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: 2012 Update by the SHEA and IDSA.* Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31(5)
2. Dubberke ER, Carling P et al. *Strategies to prevent Clostridium difficile infections in acute care hospitals: 2014 update.* Infect Control Hosp Epidemiol 2014;35: 628-645
3. Department of Health, Health Protection Agency. *Clostridium difficile infection: How to deal with the problem.* 2009
4. Debast MP et al. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection (CDI)* publicado online em 27.09.2013 doi.10.1111.1469-0691.12418
5. UK Standards for Microbiology Investigations. *Processing of faeces for Clostridium difficile.* Bacteriology | B 10 | Issue nº: 1.4 | Issue date: 29.03.12. Standards Unit, Microbiology Division, HPA
6. Scottish Microbiology & Virology Network, Scottish *C. difficile Reference Service and Health Protection Scotland. Recommended protocol or testing for Clostridium difficile and subsequent culture.* Health Protection Scotland 2012
7. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology (APIC). *Guide to Preventing Clostridium difficile infections.* Washington, DC: APIC; 2013. <http://apic.org/Resource/EliminationGuideForm/59397fc6-3f90-43d1-9325-e8be75d86888/File/2013CDiffFinal.pdf> Acedido em 3 de Fevereiro 2014-02-05
8. Plance TD et al. *Differences in outcome according to Clostridium difficile testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of C difficile infection* 2013. Lancet Infectious Diseases 13: 936-945
9. Surawicz MC et al. *Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile infections.* 2013. The American Journal of Gastroenterology 108: 478-498

10. Centers for Disease Control and Prevention. *Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee Updating the Guideline Methodology of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. Available from http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/2009-10-29HICPAC_guidelineMethodsFINAL.pdf

ANEXOS

Anexo I - Comparação dos diferentes testes laboratoriais para diagnóstico de ICD

Teste	Vantagens	Desvantagens
Teste Imunoenzimático para toxinas	Barato Rápido	Baixa sensibilidade Alta/moderada especificidade
Glutamato desidrogenase	Barato Rápido Boa sensibilidade Bom Valor Preditivo Negativo	Baixa especificidade Requer teste adicional para deteção de toxina livre
Cultura toxigénica (citotóxica) anaeróbica	Excelente sensibilidade Boa especificidade	Requer teste adicional para deteção de toxina livre Resultado demora 3/4 dias Requer capacidade para estudo de anaeróbios
Amplificação de Ácidos Nucleicos (PCR)	Rápido Excelente sensibilidade Excelente especificidade Rápido	Caro Requer teste adicional para deteção de toxina livre
Citotoxicidade celular	Boa sensibilidade	Resultado demora 2 dias Requer capacidade para cultura de tecidos

ANEXO IV- Norma DGS 018/ 2014| Prevenção e Controlo de Colonização e Infeção por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilia (MRSA) em Hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados

NÚMERO: 018/2014
DATA: 09/12/2014
ATUALIZAÇÃO: 27/04/2015

ASSUNTO: Prevenção e Controlo de Colonização e Infeção por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) nos Hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados

PALAVRAS-CHAVE: MRSA, *Staphylococcus aureus*, descontaminação, prevenção

PARA: ARS, Unidades de Saúde e Profissionais de Saúde do Sistema de Saúde

CONTACTOS: Departamento da Qualidade na Saúde (dqs@dgs.pt) e Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistências aos Antimicrobianos (ppcira@dgs.pt)

Nos termos da alínea a) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, de 26 de janeiro, a Direção-Geral da Saúde, por proposta conjunta do Departamento da Qualidade na Saúde, do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e Resistências aos Antimicrobianos e da Ordem dos Médicos, a Direção-Geral da Saúde emite a Norma seguinte:

NORMA

1. Todos os doentes, com mais de dois meses de idade corrigida, internados em unidades de cuidados intensivos e em unidades de hematologia por um tempo previsível superior a 48 horas devem ser submetidos a higiene corporal (incluindo o couro cabeludo e excetuando a face) com gluconato de clorohexidina a 2% em toalhetes, pelo menos, nos primeiros 5 dias após admissão (Categoria IB)⁽¹⁾.
2. Todos os doentes internados em unidades de cuidados intensivos e com tubo ou cânula endotraqueal devem ser submetidos a higiene oral, pelo menos três vezes por dia com gluconato de clorohexidina a 0,2%, durante o internamento (Categoria IA)⁽²⁾.
3. Todos os doentes que vão ser submetidos a cirurgias eletivas, em qualquer hospital, devem ser submetidos a:
 - a) Pelo menos, dois banhos prévios à intervenção cirúrgica, com gluconato de clorohexidina \geq a 2%, um na véspera da cirurgia e outro no dia da cirurgia (com, pelo menos, duas horas de antecedência) (Categoria IB)^(3,4);
 - b) Na cirurgia do ambulatório, deve ser fornecido ao doente, na consulta prévia, esponja impregnada de gluconato de clorohexidrina \geq a 2% para a realização de higiene pré-operatória em casa.

4. Deve ser realizada a pesquisa ativa (rastreamento) de portadores de MRSA, em todos os serviços/unidades de internamento de hospitais e unidades de internamento de cuidados continuados integrados, aos doentes com risco acrescido de colonização ou infeção por MRSA, nomeadamente (Categoria II)^(5, 8):
 - a) Todos os doentes transferidos de outras unidades hospitalares com internamento nessa unidade de saúde superior a 48 horas; e
 - b) Todos os que verifiquem um ou mais destes critérios: uso de antibióticos nos seis meses anteriores, internamento nos seis meses anteriores, hemodiálise, internamento em unidades de cuidados continuados ou lar/residência de idosos, presença de dispositivos invasivos, presença de feridas crónicas e colonização prévia por MRSA.
5. O rastreio de portadores de MRSA:
 - a) Deve ser realizado na admissão, através de zaragatoa nasal e amostra de ferida cutânea (se existir);
 - b) Doente deve permanecer em situação de isolamento de contacto até conhecimento do resultado da pesquisa.
6. No caso de isolamento de MRSA, a descolonização dos doentes deve ser efetuada com mupirocina a 2% pomada nasal (três aplicações diárias em ambas as narinas) associada a banho antisséptico como descrito no ponto 1 da presente Norma, durante, pelo menos 5 dias (Categoria II):
 - a) Uma vez efetuada a descolonização, deve monitorizar-se a sua eficácia, com realização de três rastreios de *follow-up*: o primeiro 48 horas após terminar o tratamento e os restantes com intervalos semanais;
 - b) Se a primeira descolonização falhar, deve repetir-se o procedimento, nunca se efetuando mais que dois cursos de descolonização.
7. Todos os doentes infetados ou colonizados por MRSA ou suspeitos de ter infeção ou colonização por este agente, de acordo com os critérios estipulados no ponto 4 desta Norma, devem estar em regime de "isolamento/precauções de contacto" (Categoria IA)⁽⁹⁾; os doentes infetados ou colonizados por MRSA devem ser colocados em regime de coorte específico de doentes (Categoria IB); estas circunstâncias devem estar claramente assinaladas no processo clínico.

8. Na prestação de cuidados de doentes infetados ou colonizados por MRSA ou suspeitos de ter infeção ou colonização por este agente, os profissionais de saúde devem:
- a) Adotar precauções de contacto (luvas e avental de uso único), incluindo máscara cirúrgica se risco de salpico de secreções ou fluidos, aspiração de secreções ou terapia respiratória (Categoria IB) ⁽⁹⁾;
 - b) Manter a adoção de precauções de contacto, pelo menos, até clara evidência de erradicação (três rastreios negativos após descolonização conforme 6.a), idealmente, até à saída/alta do utente ou até documentação de inexistência do agente.
9. Todo o material usado na higiene ou nos procedimentos de diagnóstico ou tratamento dos doentes infetados ou colonizados por MRSA ou suspeitos de ter infeção ou colonização por este agente, de acordo com os critérios estipulados no ponto 4 desta Norma, deve ser individualizado.
10. Os doentes infetados ou colonizados por MRSA ou suspeitos de ter infeção ou colonização por este agente, de acordo com os critérios estipulados no ponto 4 desta Norma, sempre que for possível, devem ser internados em quarto, idealmente com sanitários independentes (Categoria IB) ⁽⁹⁾.
11. A deslocação entre serviços/unidades de internamento ou para a realização de exames complementares de diagnóstico dos doentes colonizados/infetados por MRSA e dos doentes com suspeita de colonização/infeção por MRSA:
- a) Deve ser programada de modo a reduzir os períodos de espera e deve ser assegurado, sem embargo da necessária consideração de outros critérios, que estes doentes sejam os últimos a serem deslocados e a realizar exames;
 - b) Antes da deslocação, a roupa do doente e da cama deve ser mudada, para reduzir o risco de contaminação e, se possível, os doentes com infeção respiratória devem usar máscara cirúrgica (Categoria II) ⁽⁹⁾.
12. O acompanhante e as visitas dos doentes colonizados ou infetados por MRSA e dos doentes com suspeita de colonização/infeção por MRSA devem usar medidas de proteção de contacto e a equipa assistencial (médico e/ou enfermeiro) deve-lhes fornecer educação para a saúde sobre medidas de contenção na fonte, ao acompanhante e visitas do doente, nomeadamente:
- a) Higiene das mãos antes e depois de contactar com o doente; e

b) Eviscção do contacto com outros doentes do serviço/unidade de internamento (Categoria IC) ⁽⁹⁾.

13. Todos os colaboradores de limpeza e assistentes operacionais devem receber formação em serviço, com carácter obrigatório, sobre boas práticas em limpeza ambiental das superfícies da unidade do doente.

14. Devem ser, igualmente, cumpridas as seguintes atitudes já contidas em normas previamente publicadas pela Direção-Geral da Saúde ou em Despacho do Diário da República:

a) Precauções básicas de controlo de infeção, incluindo, a higiene das mãos, de acordo com a Norma n.º 029/2012, atualizada a 14/10/2013 (Categoria IA) ⁽¹⁰⁾ e adesão institucional à Campanha Nacional de Precauções Básicas de Controlo de Infeção;

b) Limpeza ambiental das superfícies da unidade do doente:

i. Boas práticas em limpeza ambiental das superfícies da unidade do doente, sobretudo as de maior contacto manual (e.g., barras da cama, maçanetas, interruptores, campainhas) (Categoria IB);

ii. Deve ser efetuada monitorização da eficácia da limpeza ambiental das superfícies da unidade do doente, por bioluminescência.

c) Boas práticas em procedimentos de impacte elevado (Categoria IA), tais como algaliação e outros procedimentos nas vias urinárias, colocação e manuseio de dispositivos intravasculares, procedimentos nas vias aéreas inferiores e, em particular, em doentes submetidos a ventilação mecânica invasiva e intervenções cirúrgicas (Orientações da OMS para a Cirurgia Segura 2009. Cirurgia Segura Salva Vidas)⁽³⁾;

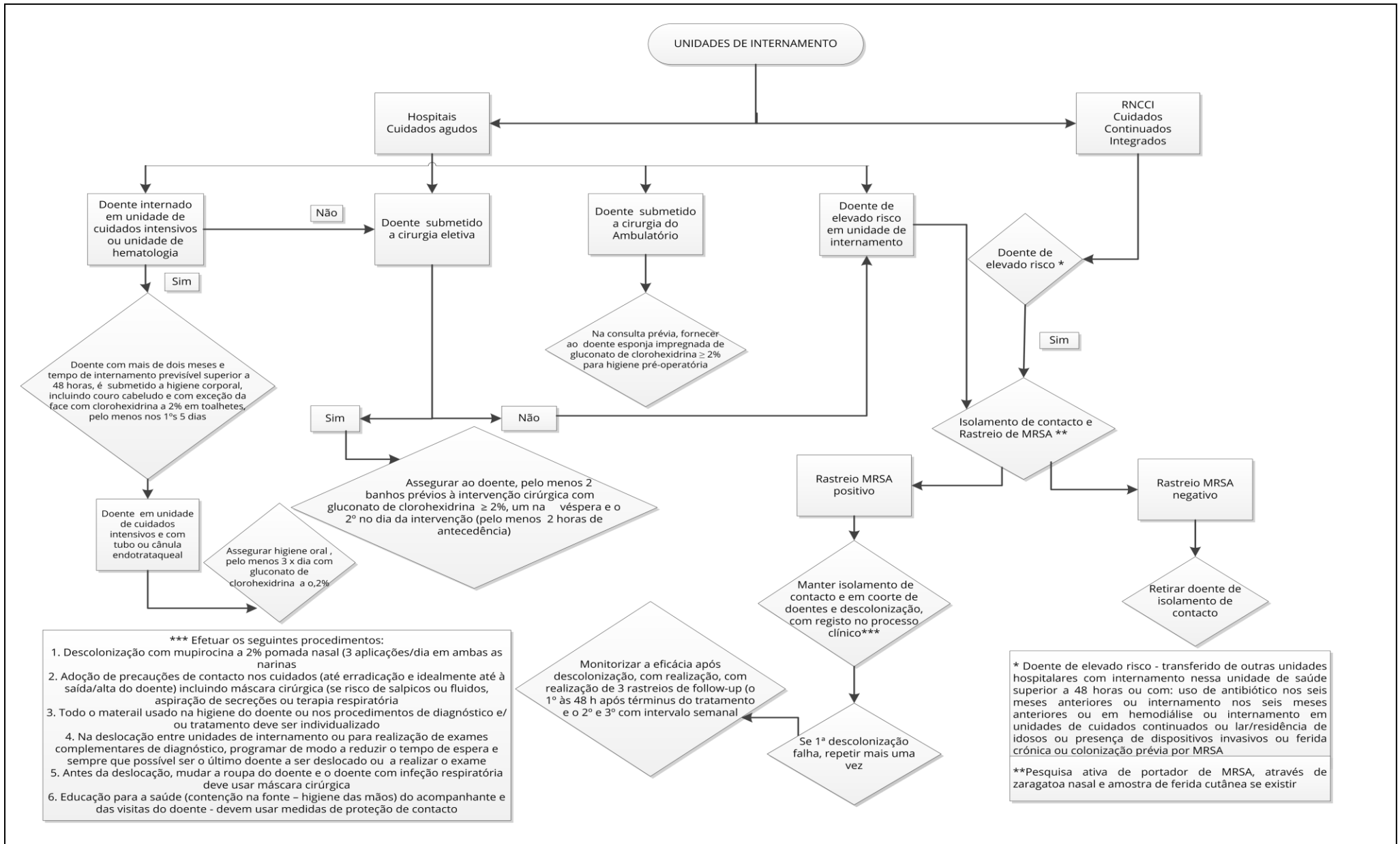
d) Composição e características estruturais dos Grupos Coordenadores Locais do Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e de Resistências aos Antimicrobianos (GCL-PPCIRA), de acordo com o Despacho n.º 15423/2013 D.R. n.º 229, Série II, de 26 de novembro, que configura aproximação à média europeia do número médio de médicos e enfermeiros da área de controlo de infeção e das resistências aos antimicrobianos, com horário completo, por hospital;

e) Notificação, no prazo máximo de 48 horas, pelo laboratório de microbiologia, ao GCL-PPCIRA e aos clínicos assistentes de todos os novos casos de colonização ou infeção por MRSA (Categoria IC);

- f) Implementação e prática de programas de apoio à prescrição de antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*), com o objetivo de anular o uso desnecessário ou inadequado de antimicrobianos (Categoria IB) ⁽¹¹⁾;
- g) Adesão ao registo obrigatório de infeções nosocomiais da corrente sanguínea, na plataforma INCS, nomeadamente das causadas por *Staphylococcus aureus*, e aos restantes sistemas de vigilância epidemiológica de infeções e de resistências aos antimicrobianos definidos como obrigatórios pelo Despacho 15423/2013 D.R. n.º 229, Série II, de 26 de novembro (Categoria IC) ⁽¹¹⁾;
- h) Informação entre serviços, ou entre instituições no caso de saída/alta ou transferência, sempre que doentes colonizados ou infetados por MRSA ou suspeitos de colonização/infeção por MRSA são transferidos, incluindo notificação entre clínicos e ao Grupo de Coordenação Local do Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e de Resistências aos Antimicrobianos; devendo, também, ser fornecida informação sobre se foi realizado ou não rastreio de colonização por MRSA e se foi ou não realizada descolonização e com que resultado;
- i) Obtenção e análise local de indicadores relacionados com colonização e com infeção por MRSA, nomeadamente os citados no capítulo “Avaliação” da presente Norma;
- j) A colonização por microrganismo multirresistente, nomeadamente por MRSA não constitui indicação para não dar alta hospitalar ao doente, antes de completar a descolonização, nomeadamente do hospital de cuidados de agudos para a unidade de internamento de cuidados continuados integrados ou lar/residência para idosos;
- k) Os doentes infetados com microrganismos multirresistentes em tratamento com antibióticos de uso exclusivo hospitalar não são admitidos na Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados, de acordo com a Circular Informativa n.º 17/DSQ/DSC de 20/09/2007.

15. Qualquer exceção à presente Norma é fundamentada clinicamente, com registo no processo clínico.

16.O algoritmo clínico



17.O instrumento de auditoria

Instrumento de Auditoria Clínica				
Norma " Prevenção e Controlo de Colonização e Infeção por <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina (MRSA) nos Hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Continuados"				
Unidade: _____				
Data: ___/___/___ Equipa auditora: _____				
1: Doente Internado em Unidade de Cuidados Intensivos ou Unidade de Hematologia				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que o doente com mais de dois meses de idade corrigida internado por um tempo previsível superior a 48 horas, é submetido a higiene corporal (incluindo o couro cabeludo e excetuando a face) com gluconato de clorohexidina a 2% em toalhetes, pelo menos, nos primeiros 5 dias após admissão				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
2: Doente Internado em Unidade de Cuidados Intensivos				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que o doente com mais de dois meses de idade corrigida, internado por um tempo previsível superior a 48 horas, é submetido a higiene corporal (incluindo o couro cabeludo e excetuando a face) com gluconato de clorohexidina a 2% em toalhetes, pelo menos, nos primeiros 5 dias após admissão				
Existe evidência de que o doente internado é submetido a higiene oral, pelo menos, três vezes por dia com gluconato de clorohexidina a 0,2%, durante o internamento				
Existe evidência de que o doente internado com tubo ou cânula endotracheal é submetido a higiene oral, pelo menos, três vezes por dia com gluconato de clorohexidina a 0,2%, durante o internamento				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
3: Doente Submetido a Cirurgia Eletiva				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que o doente que vai ser submetido a cirurgia eletiva, em qualquer hospital, é submetido a, pelo menos, dois banhos prévios à intervenção cirúrgica, com gluconato de clorohexidina \geq a 2%, um na véspera da cirurgia e outro no dia da cirurgia (com, pelo menos, duas horas de antecedência)				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
4: Doente Submetido a Cirurgia de Ambulatório				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que na cirurgia do ambulatório, é fornecido ao doente, na consulta prévia, esponja impregnada de gluconato de clorohexidrina \geq a 2% para a realização de higiene pré-operatória em casa				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
5: Doentes de Elevado Risco em Hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE



Existe evidência de que é realizada a pesquisa ativa (rastreio) de portadores de MRSA, em todos os serviços/unidades de internamento de hospitais e unidades de internamento de cuidados continuados integrados, ao doente com risco acrescido de colonização ou infeção por MRSA, nomeadamente: a) doente transferido de outra unidade hospitalar com internamento nessa unidade superior a 48 horas; e b) doente em que se verifique um ou mais dos seguintes critérios: uso de antibióticos nos seis meses anteriores, internamento nos seis meses anteriores, hemodiálise, internamento em unidade de cuidados continuados ou lar/residência de idosos, presença de dispositivos invasivos, presença de feridas crónicas e colonização prévia por MRSA				
Existe evidência de que o rastreio de portador de MRSA é realizado na admissão, através de zaragatoa nasal e amostra de ferida cutânea (se existir)				
Existe evidência de que o doente submetido ao rastreio de portador de MRSA permanece em situação de isolamento de contacto até conhecimento do resultado da pesquisa				
Existe evidência de que no caso de isolamento de MRSA, a descolonização do doente é efetuada com mupirocina a 2% pomada nasal (três aplicações diárias em ambas as narinas) associada a banho antisséptico como descrito no ponto 1 da presente Norma, durante, pelo menos 5 dias				
Existe evidência de que se a primeira descolonização falhar, se repete o procedimento, nunca se efetuando mais que dois cursos de descolonização				
Existe evidência de que esta estratégia, de descolonização do doente, implementada, não exclui que o utente possa ter alta antes de a completar				
Existe evidência de que o doente infetado ou colonizado por MRSA ou suspeito de ter infeção ou colonização por este agente, de acordo com os critérios estipulados no ponto 4 desta Norma, devem estar em regime de "isolamento/precauções de contacto" e em coorte específico de doentes, sendo estas situações claramente assinaladas no processo clínico				
Existe evidência de que na prestação de cuidados ao doente infetado ou colonizado por MRSA ou suspeitos de ter infeção ou colonização por este agente, o profissional de saúde adota precauções de contacto (luvas e avental de uso único), incluindo máscara cirúrgica se risco de salpico de secreções ou fluidos, aspiração de secreções ou terapia respiratória				
Existe evidência de que na prestação de cuidados ao doente infetado ou colonizado por MRSA ou suspeito de ter infeção ou colonização por este agente, o profissional de saúde mantém a adoção de precauções de contacto, pelo menos, até clara evidência de erradicação (três rastreios negativos após descolonização, de acordo com critério estabelecido na alínea a) do ponto 6 desta Norma, idealmente, até à saída/alta do doente ou até documentação de inexistência do agente				
Existe evidência de que todo o material usado na higiene ou nos procedimentos de diagnóstico ou tratamento do doente infetado ou colonizado por MRSA ou suspeito de ter infeção ou colonização por este agente, de acordo com os critérios estipulados no ponto 4 desta Norma, é individualizado				
Existe evidência de que, sempre que for possível, o doente infetado ou colonizado por MRSA ou suspeito de ter infeção ou colonização por este agente, de acordo com os critérios estipulados no ponto 4 desta Norma, é internado em quarto, idealmente com sanitários independentes				
Existe evidência de que na deslocação entre serviços/unidades de internamento ou para a realização de exames complementares de diagnóstico do utentes colonizado/infetado por MRSA e do doente com suspeita de colonização/infeção por MRSA, é programada de modo a reduzir os períodos de espera e é assegurado, sem embargo da necessária consideração de outros critérios, que o doente seja o último a ser				



deslocado e a realizar exames				
Existe evidência de que antes da deslocação entre serviços/unidades de internamento ou para a realização de exames complementares de diagnóstico do doente colonizado ou infetado por MRSA e do doente com suspeita de colonização ou infeção por MRSA, a roupa do doente e da cama é mudada, para reduzir o risco de contaminação e, se possível, o doente com infeção respiratória usa máscara cirúrgica				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
6: Estrutura e Processo				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que são cumpridas as Precauções Básicas de Controlo de Infeção, incluindo a higiene das mãos, de acordo com a Norma n.º 029/2012, atualizada a 14/10/2013 e adesão institucional à Campanha Nacional de Precauções Básicas de Controlo de Infeção				
Existe evidência de que são cumpridas boas práticas em limpeza ambiental das superfícies da unidade do utente, sobretudo as de maior contacto manual (e.g., barras da cama, maçanetas, interruptores, campainhas)				
Existe evidência de que são cumpridas boas práticas em procedimentos de impacte elevado: algaliação e outros procedimentos nas vias urinárias; colocação e manuseio de dispositivos intravasculares; procedimentos nas vias aéreas inferiores; e, em particular, em utentes submetidos a ventilação mecânica invasiva e intervenções cirúrgicas				
Existe evidência da composição e características estruturais do Grupo Coordenador Local do Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e de Resistências aos Antimicrobianos (GCL-PPCIRA), de acordo com o Despacho n.º 15423/2013 D.R. n.º 229, Série II, de 26 de novembro, que configura aproximação à média europeia do número médio de médicos e enfermeiros da área de controlo de infeção e das resistências aos antimicrobianos, com horário completo, por hospital				
Existe evidência de que a notificação de todos os novos casos de colonização ou infeção por MRSA é efetuada, no prazo de 48 horas, pelo laboratório de microbiologia ao GCL-PPCIRA e aos clínicos assistentes				
Existe evidência da implementação e prática de programa de apoio à prescrição de antimicrobianos (<i>antimicrobial stewardship</i>), com o objetivo de anular o uso desnecessário ou inadequado de antimicrobianos				
Existe evidência da Adesão ao Registo Obrigatório de Infeções Nosocomiais da Corrente sanguínea, na plataforma INCS, nomeadamente das causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> , e aos restantes sistemas de vigilância epidemiológica de infeções e de resistências aos antimicrobianos definidos como obrigatórios pelo Despacho n.º 15423/2013, D.R. n.º 229, Série II, de 26 de novembro				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
7: Acompanhante e Visitas do Doente				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que o acompanhante e visita(s) do doente colonizado ou infetado por MRSA e do doente com suspeita de colonização ou infeção por MRSA usa(m) medida(s) de proteção de contacto				
Existe evidência de que ao acompanhante e visita(s) do doente colonizado ou infetado (s) por MRSA e do doente com suspeita de colonização ou infeção por MRSA, a equipa assistencial (médico e/ou enfermeiro) efetua educação para a saúde sobre medidas de contenção na fonte, nomeadamente, sobre: higiene das mãos antes e depois de contactar com				



o doente; e evicção do contacto com outros doentes do serviço/unidade de internamento				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
8: Formação em Serviço, com Carácter Obrigatório				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que o colaborador de limpeza e o assistente operacional é detentor de formação em serviço sobre boas práticas em limpeza ambiental das superfícies da unidade do doente				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
9: Monitorização e Avaliação				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência de que após a realização da descolonização do doente, é monitorizada a sua eficácia, com realização de três rastreios de follow-up, sendo o primeiro 48 horas após o término do tratamento e os restantes com intervalos semanais				
Existe evidência de que é efetuada monitorização da eficácia da limpeza ambiental das superfícies da unidade do doente por bioluminescência				
Existe evidência da obtenção e análise local de indicadores relacionados com colonização e com infeção por MRSA, nomeadamente, os citados no capítulo "Avaliação" da presente Norma				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
10: Saída/Alta do Doente				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/ FONTE
Existe evidência da informação entre serviços, ou entre unidades de saúde, no caso de saída/alta ou transferência, sempre que o doente colonizado ou /infetado por MRSA ou suspeito de colonização ou infeção por MRSA é transferido, incluindo notificação entre clínicos e ao Grupo de Coordenação Local do Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e de Resistências aos Antimicrobianos, sendo ainda fornecida informação sobre: realização ou não de rastreio de colonização por MRSA; realização ou não de descolonização; e resultado				
Existe evidência de que a colonização por microrganismo multirresistente, nomeadamente por MRSA não constitui indicação para não dar alta hospitalar ao doente, antes de completar a descolonização, nomeadamente do hospital de cuidados de agudos para a unidade de internamento de cuidados continuados integrados ou lar/residência para idosos				
Existe evidência de que o doente infetado com microrganismo multirresistente em tratamento com antibióticos de uso exclusivo hospitalar não é admitido na Rede Nacional de Unidades de Cuidados Continuados Integrados, de acordo com a Circular Informativa n.º 17/DSQ/DSC de 20/09/2007				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			

Avaliação de cada padrão: $x = \frac{\text{Total de respostas SIM}}{\text{Total de respostas aplicáveis}} \times 100 = (\text{IQ}) \text{ de } \dots\%$



DGS desde
1899
Direção-Geral da Saúde



NORMA |
da Direção-Geral da Saúde

18.A presente Norma, atualizada com os contributos científicos recebidos durante a discussão pública, revoga a versão de 9/12/2014 e será atualizada sempre que a evolução da evidência científica assim o determine.

19.O texto de apoio seguinte orienta e fundamenta a implementação da presente Norma

Francisco George
Diretor-Geral da Saúde

TEXTO DE APOIO

Conceito, definições e orientações

- A. Na presente Norma foram utilizadas as categorias do CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*)/HICPAC (*Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee*)¹² indicativas da força e qualidade da evidência da recomendação:
- 1) *Categoria IA* - Medidas de adoção fortemente recomendada e fortemente apoiadas por estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais bem desenhados;
 - 2) *Categoria IB* - Medidas de adoção fortemente recomendada, apoiadas por alguns estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais e por uma forte fundamentação teórica;
 - 3) *Categoria IC* - Medidas preconizadas pelas recomendações de outras federações e associações;
 - 4) *Categoria II* - Medidas de adoção sugeridas para implementação, apoiadas em estudos epidemiológicos ou clínicos sugestivos ou numa fundamentação teórica;
 - 5) Sem recomendação - Práticas com insuficiente evidência ou sem consenso sobre a sua eficácia.
- B. As medidas da presente Norma baseiam-se no pressuposto de estratégia horizontal, não específicas de microrganismo, com intervenções efetivas no controlo de todos os microrganismos patogénicos transmitidos pelos mesmos mecanismos e com impacto num número significativo de infeções hospitalares; são propostas estratégias verticais apenas para doentes com alto risco de colonização/infeção por MRSA.
- C. Áreas hospitalares como serviços ou unidades de medicina intensiva, unidades ou serviços de hematologia, unidades ou serviços de neonatologia, queimados, transplante, traumatologia/ortopedia, cirurgia cardiotorácica, cirurgia vascular e nefrologia (incluindo hemodiálise) são locais em que a disseminação da colonização ou infeção por MRSA se associa a complicações mais graves, maior probabilidade de infeções invasivas ou maiores dificuldades na abordagem terapêutica dos doentes⁽⁹⁾. Estes serviços/unidades de internamento devem considerar-se prioritários no controlo de MRSA endémico.
- D. Os principais fatores de risco acrescido para colonização/infeção por MRSA são o uso de antibióticos nos seis meses anteriores, internamentos prolongados recentes, internamentos recentes em unidades de cuidados intensivos, hemodiálise, unidades de internamento de cuidados continuados



ou residências/lares de idosos, presença de dispositivos invasivos e feridas crónicas, colonização prévia por MRSA e proximidade com doentes colonizados ou infetados por MRSA ^(7,8,13).

- E. A pesquisa ativa de portadores de MRSA na admissão, quando indicada, deve idealmente ser realizada por biologia molecular, já que esta metodologia permite a obtenção de resultados mais rápidos, com redução de custos em medidas de isolamento de contacto.
- F. Os doentes colonizados/infetados por MRSA não devem estar próximos de doentes com risco acrescido de contrair infeção, como, por exemplo, utentes imunodeprimidos, traqueostomizados, com cateteres centrais ou feridas ^(14,15).
- G. Face à escassez de quartos individuais em Portugal, deve ser feita uma avaliação de risco para isolar os doentes com maior transmissibilidade (infeções cutâneas e infeções respiratórias com dificuldade na contenção das secreções).

Fundamentação

- A. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria comensal que coloniza as narinas (reservatório primário), axilas, faringe, vagina e/ou superfícies cutâneas lesadas ⁽¹⁶⁾. Estima-se que possa colonizar a pele em até 30% dos indivíduos saudáveis ^(16, 17). Esta bactéria apresenta capacidades únicas de invadir e provocar doença em tecidos previamente saudáveis em qualquer local do corpo humano ⁽¹⁸⁾. As infeções podem surgir quando ocorre uma solução de continuidade na pele ou mucosas, que permita o acesso da bactéria aos tecidos vizinhos ou à corrente sanguínea ⁽¹⁸⁾. Estão particularmente em risco: pele e tecidos moles, aparelho respiratório, osso, articulações e corrente sanguínea ⁽¹⁹⁾. O risco de infeção aumenta com a presença de material protésico, incluindo cateteres intravasculares ⁽¹⁸⁾.
- B. As primeiras estirpes de MRSA foram descritas em 1961, pouco tempo após a introdução da meticilina, uma penicilina sintética desenvolvida para ultrapassar a resistência à penicilina, e os primeiros surtos de MRSA foram registados no início da década de 60 do século passado ^(20,21). A emergência de MRSA resultou provavelmente da pressão seletiva do uso de antibióticos ⁽²²⁾.
- C. Na atualidade, *Staphylococcus aureus* permanece uma das principais causas de infeções da comunidade e sobretudo associadas a cuidados de saúde ⁽¹⁹⁾. A emergência da resistência a meticilina transformou este agente patogénico ubíquo num desafio terapêutico à escala global. Atualmente, MRSA é o agente etiológico mais frequente de infeções associadas a cuidados de saúde resistentes a antimicrobianos no mundo ⁽²³⁾.



- D. Em 2008, na Europa, as infeções por MRSA representaram 44% das infeções hospitalares, sendo responsáveis por um acréscimo de 41% de dias de internamento e 21% da mortalidade resultante das infeções hospitalares ⁽²⁴⁾. Estima-se que as infeções por MRSA afetem mais de 150.000 doentes, anualmente, com um acréscimo de custos atribuíveis de 380.000 M€ aos sistemas de saúde da União Europeia ⁽⁵⁾. Por este motivo, a monitorização da epidemiologia e do impacto da infeção por MRSA nos países europeus é crucial, sendo que, as taxas de infeção da corrente sanguínea por MRSA têm sido utilizadas como um indicador de qualidade de cuidados ⁽⁵⁾.
- E. Os dados do inquérito europeu de prevalência de infeção de 2011-2012 mostraram que *Staphylococcus aureus* foi o agente responsável por 12,3% das infeções adquiridas em cuidados de saúde, sendo o segundo agente mais frequentemente identificado num grupo heterogéneo de infeções. A taxa de resistência à meticilina calculada foi de 41,2% ⁽²⁵⁾.
- F. Os dados do Programa EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance*) demonstram que em muitos países tem vindo a ocorrer uma diminuição significativa da incidência de infeções por MRSA e da proporção de casos de MRSA sobre o número total de infeções por *Staphylococcus aureus*. Por exemplo, no Reino Unido, de 2008 a 2011, verificou-se uma redução da proporção de MRSA de 31,0% para 13,6%, o que atesta o impacto e o sucesso das medidas preventivas adotadas, nomeadamente:
- 1) Declaração obrigatória de todas as bacteriemias por MRSA;
 - 2) Divulgação pública e comparação entre hospitais das taxas de incidência de infeções por MRSA;
 - 3) Promoção de uma campanha nacional de lavagem das mãos;
 - 4) Políticas de utilização racional de antibióticos;
 - 5) Implementação de medidas denominadas "intervenções de alto impacto" (*high impact interventions*) em procedimentos com aumento do risco de infeção, por exemplo, cuidados com cateteres venosos centrais e procedimentos cirúrgicos ⁽⁵⁾.
- G. De 2008 a 2011, verificam-se valores sempre inferiores a 5% em alguns países do norte da Europa, valores sempre superiores a 25% noutros países (e.g., Grécia, Chipre, Itália, Malta, Roménia) e, persistentemente, acima dos 50% em Portugal ^(23,26).
- H. Nos últimos anos têm sido realizados em Portugal vários inquéritos de prevalência de infeções adquiridas no hospital e do uso de antimicrobianos. No inquérito realizado em maio de 2003, *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais frequentemente isolado nas infeções nosocomiais,



em 18,5% dos casos, com uma taxa de resistência à meticilina de 41,1%. Nos inquéritos realizados em Março de 2009 e Março de 2010, *Staphylococcus aureus* manteve-se o microrganismo mais isolado nas infeções nosocomiais com 15,8% (71,8% MRSA) e 19,4% (69,2% MRSA) dos isolamentos, respetivamente ^(27,28).

- I. O último inquérito de Prevalência de Infeção Adquirida no Hospital e do Uso de Antimicrobianos nos Hospitais Portugueses, que decorreu de 23 de Maio a 8 de Junho de 2012, foi integrado no estudo do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e contou com a participação obrigatória dos hospitais públicos ⁽²⁷⁾. *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais frequente (17,0% do total dos isolamentos), com uma taxa de resistência à meticilina de 80% e tendo sido o agente patogénico principal nas pneumonias (25,0%), nas infeções do local cirúrgico (24,8%) e da corrente sanguínea (18,6%) ⁽²⁸⁾.
- J. Na vigilância das infeções nosocomiais da corrente sanguínea (INCS) a nível nacional, a percentagem de INCS por MRSA sobre o total de INCS por *Staphylococcus aureus* tem variado, nos últimos seis anos, entre 59,7% e 67,3% e a taxa de INCS por MRSA por 1000 dias de internamento entre 0,16 e 0,18.
- K. A 13 Maio de 2013, foi isolado no nosso país o primeiro caso europeu de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* ou VRSA) ⁽¹²⁾.
- L. Em Portugal, as taxas de infeção por *Staphylococcus aureus* e, em particular, por MRSA, mantêm-se muito elevadas, assumindo um carácter endémico e de preocupação crescente perante a possibilidade da ocorrência e disseminação de mais casos de VRSA.
- M. Na situação específica de Portugal em que a colonização/infeção por *Staphylococcus aureus* e MRSA assume características endémicas é preciso ter, ainda, em consideração que [adaptado de ⁽²⁹⁾]:
- 1) As unidades de saúde estão expostas a um elevado número de indivíduos portadores ou colonizados com baixa perceção dos riscos e ameaças desta bactéria;
 - 2) A adesão às medidas de higiene das mãos e precauções de contacto é consistentemente mais baixa nos hospitais com maior prevalência de MRSA;
 - 3) A redução do número de profissionais de saúde abaixo dos requisitos mínimos é um importante preditor de má adesão às medidas de controlo e de aumento das taxas de MRSA.

N. Acresce que se constatou, em estudo realizado entre Maio 2009 e Fevereiro de 2010, que em 26% dos corrimãos dos autocarros públicos em circulação na cidade do Porto a pesquisa de MRSA era



- positiva ⁽³⁰⁾. De igual modo, um estudo realizado nos autocarros públicos de Lisboa, entre Maio de 2011 e Maio de 2012, revelou a presença de MRSA em 36,2% de um total de 199 autocarros analisados ⁽³¹⁾.
- O. Nos hospitais com níveis endémicos de colonização/infeção por MRSA está documentada uma baixa adesão às medidas de higiene das mãos ^(28, 32). Portugal aderiu à estratégia da *World Alliance for Patient Safety* da Organização Mundial da Saúde, em 2008, com a Campanha Nacional de Higiene das Mãos - "Medidas Simples Salvam Vidas". Em 2010, foram avaliados 78 hospitais e a média nacional da taxa de adesão dos profissionais de saúde às práticas de higiene das mãos foi de 64%, com o valor mais baixo de 50% nos médicos ⁽³²⁾. É fundamental o aumento do número de formadores e observadores/auditores, a par de campanhas de sensibilização e de divulgação de resultados a nível local e nacional.
- P. Está documentada uma relação significativa entre o consumo de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistências, nomeadamente com o risco de colonização e infeção por MRSA ⁽⁶⁾.
- Q. Num estudo multicêntrico recente, envolvendo 7727 doentes internados em UCI ou unidades de transplante de medula óssea, a higiene diária corporal dos doentes com toalhetes de gluconato de clorohexidina a 2%, levou a uma redução significativa da aquisição de microrganismos multirresistentes e a uma redução de 28% das infeções da corrente sanguínea ⁽¹⁾.
- R. A higiene corporal repetida e continuada com gluconato de clorohexidina (e.g., solução aquosa a 2% ou 4%) pode originar irritação e/ou reações de hipersensibilidade de pele e mucosas ⁽³⁾.
- S. O dicloridrato de octenidina e fenoxietanol (solução cutânea ou toalhetes) parece ter efetividade similar à do gluconato de clorohexidina, nos estudos realizados, embora estes tenham carácter não controlado e não aleatorizado e envolvam muito menor número de doentes ^(33,34).
- T. O rastreio extranasal aumenta a deteção de colonização por MRSA em cerca de 33% quando comparado com o rastreio nasal, detetando este 66% dos portadores de MRSA. Amostras de orofaringe, axilas, feridas e reto aumentam a deteção em 21%, 7%, 17% e 20%, respetivamente. A avaliação extranasal tem, sobretudo, valor no controlo de surtos ou na exclusão de doença persistente após descolonização ⁽³⁵⁾.



Avaliação

- A. A avaliação da implementação da presente Norma é contínua, executada a nível local, regional e nacional, através de processos de auditoria interna e externa.
- B. A parametrização dos sistemas de informação para a monitorização e avaliação da implementação e impacto da presente Norma é da responsabilidade das Administrações Regionais de Saúde e das direções dos hospitais.
- C. A efetividade da implementação da presente Norma nos cuidados hospitalares agudos e cuidados continuados e a emissão de diretivas e instruções para o seu cumprimento é da responsabilidade das direções clínicas dos hospitais e dos diretores das unidades de internamento de cuidados continuados integrados.
- D. A implementação da presente Norma pode ser monitorizada e avaliada através dos seguintes indicadores:
- 1) Proporção de doentes internados em UCI ou em unidades de hematologia e submetidos a higiene corporal com gluconato de clorohexidina:
 - a) Numerador: Número de doentes internados em UCI ou em unidades de hematologia e submetidos a higiene corporal com gluconato de clorohexidina conforme descrito nos termos da presente Norma;
 - b) Denominador: Número total de doentes admitidos em UCI ou em unidades de hematologia.
 - 2) Proporção de doentes internados em UCI e com tubo ou cânula endotraqueal e submetidos a higiene oral com gluconato de clorhexidina:
 - a) Numerador: Número de doentes internados em UCI e com tubo ou cânula endotraqueal e submetidos a higiene oral com gluconato de clorhexidina conforme descrito nos termos da presente Norma;
 - b) Denominador: Número total de doentes internados em UCI e com tubo ou cânula endotraqueal.
 - 3) Proporção de doentes submetidos a higiene com gluconato de clorohexidrina nas 24 horas anteriores a cirurgia eletiva:



- a) Numerador: Número de doentes submetidos a higiene com gluconato de clorohexidina nas 24 horas anteriores a cirurgia eletiva;
 - b) Denominador: número total de doentes submetidos a cirurgia eletiva.
- 4) Número de bacteriemias adquiridas no hospital por MRSA por 1000 dias de internamento;
- 5) Proporção de bacteriemia adquiridas no hospital por MRSA:
- a) Numerador: Número de bacteriemias adquiridas no hospital por MRSA;
 - b) Denominador: Total de bacteriemias adquiridas no hospital por *Staphylococcus aureus*.
- 6) Taxa de incidência cumulativa de infeção ou colonização por MRSA:
- a) Numerador: número de novos casos com isolamento de MRSA nosocomial*;
 - b) Denominador: número de admissões com internamento ≥ 48 horas x 100).
- 7) Proporção de doentes infetados por MRSA internados em isolamento ou coorte:
- a) Numerador: número de doentes infetados por MRSA internados em isolamento ou coorte;
 - b) Denominador: Total de doentes infetados por MRSA.
- 8) DDD de quinolonas e de cefalosporinas na unidade de saúde ou serviço/unidade de internamento.

* Doentes em que o exame microbiológico em que é isolado o MRSA foi colhido ≥ 48 horas após o internamento hospitalar e excluindo utentes com infeção ou colonização prévia por MRSA, como tal indicador de transmissão hospitalar de MRSA.

Comité Científico

A. A proposta da presente Norma foi elaborada no âmbito do Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde, do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianas e do Conselho para Auditoria e Qualidade da Ordem dos Médicos, através dos seus Colégios de Especialidade ao abrigo dos protocolos existentes entre a Direção-Geral da Saúde e a Ordem dos Médicos.

- B. A proposta científica da presente Norma foi elaborada por Filipe Froes, Carla Mimoso Santos, José Diogo, Elaine Pina, Maria Goreti Silva, António Sousa Uva, José Artur Paiva (coordenação científica).
- C. A elaboração da proposta da presente Norma teve ainda o apoio científico de Daniela Pires, Dinah Carvalho, Álvaro Aires Pereira e do Conselho Científico do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA).
- D. Todos os peritos envolvidos na elaboração da presente Norma cumpriram o determinado pelo Decreto-Lei n.º 14/2014 de 22 de janeiro, no que se refere à declaração de inexistência de incompatibilidades.
- E. A avaliação científica do conteúdo final da presente Norma foi efetuada no âmbito do Departamento da Qualidade na Saúde.

Coordenação Executiva

Na elaboração da presente Norma a coordenação executiva foi assegurada por Cristina Martins d'Arrábida, do Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde.

Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas

Pelo Despacho n.º 7584/2012, do Secretário de Estado Adjunto do Ministro da Saúde, de 23 de maio, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 107, de 1 de junho de 2012, a Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas tem como missão a validação científica do conteúdo das Normas Clínicas emitidas pela Direção-Geral da Saúde. Nesta Comissão, a representação do Departamento da Qualidade na Saúde é assegurada por Henrique Luz Rodrigues.

Siglas/Acrónimos

Siglas/Acrónimos	Designação
DDD	Dose Definida Diária
INCS	Infeções Nosocomiais da Corrente Sanguínea
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
RNCCI	Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
VRSA	<i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>

Referências Bibliográficas

1. Climo MW, Yokoe DS, Warren DK, Perl TM, Bolon M, Herwaldt LA, et al. *Effect of daily chlorhexidine bathing on hospital-acquired infection*. N Engl J Med. 2013 Feb 7;368(6):533–42.
2. Chan EY, Ruest A, Meade MO, Cook DJ. *Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis*. BMJ. 2007 Apr 28;334(7599):889.
3. World Health Organization. Orientações da OMS para a Cirurgia Segura 2009. Cirurgia Segura Salva Vidas [Internet]. Direção-Geral da Saúde; 2010. Available from: <http://www.dgs.pt>
4. Edmiston CE, Okoli O, Graham MB, Sinski S, Seabrook GR. *Evidence for using chlorhexidine gluconate preoperative cleansing to reduce the risk of surgical site infection*. AORN J. 2010 Nov;92(5):509–18.
5. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe*. Euro Surveill. 2010 Oct 14;15(41):19688.
6. Anderson DJ. *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in adults*. UpToDate [Internet]. 2013. Available from: http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-infection-in-adults?topicKey=ID%2F3157&elapsedTimeMs=5&source=search_result&searchTerm=MRSA+epidemiologia&selectedTitle=1~150&view=print&displayedView=full
7. Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. *Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med [Internet]. 1982;(97):309–17. Available from: <http://annals.org/article.aspx?articleid=695856>
8. Boyce JM. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Detection, epidemiology, and control measures*. Infect Dis Clin North Am. 1989 Dec;(4):901–13.
9. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, Asensio Á, Delgado T, et al. *Vigilancia y control de Staphylococcus aureus resistente a metilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMSPH*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(5):285–98.
10. Direção-Geral da Saúde. Orientação de Boa Prática para a Higiene das Mãos nas Unidades de Saúde. Circular Normativa N.º 13/DQS/DSD. Direção-Geral da Saúde [Internet]. 2010 Jun 14. Available from: <http://www.dgs.pt/ms/3/default.aspx?pl=&id=5514&access=0>
11. Direção-Geral da Saúde. Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e Resistência aos Antimicrobianos. Orientações Programáticas. Direção-Geral da Saúde [Internet]. 2013 Jun 12. Available from: <http://www.dgs.pt>
12. Centers for Disease Control and Prevention. *Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee Updating the Guideline Methodology of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. Available from http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/2009-10-29HICPAC_guidelineMethodsFINAL.pdf

13. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection*. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 Jan 15;39(6):776–82.
14. Ayliffe PGAJ, Buckles MA, Casewell MW, Cookson BD, Cox RA, Duckworth GJ, et al. *Revised guidelines for the control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in hospitals: Report of a combined working party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, the Hospital Infection Society and the Infection Control Nurses Association*. *The Journal of hospital infection*. W.B. Saunders For The Hospital Infection Society; 1998. pp. 253–90.
15. Edmond MB, Wenzel RP, Pasculle W. *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus. Perspectives on measures needed for control*. *Annals of Internal Medicine*. 1996;124(3):329–34.
16. Casewell MW, Hill RLR. *The carrier state: methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1986 Jan 1;18(Supplement A):1–12.
17. European Centre for Disease Control and Prevention. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC; 2011.
18. Lowy FD. *Staphylococcus aureus Infections*. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 1998 Aug 20;339(8):520–32.
19. Boucher H, Miller LG, Razonable RR. *Serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 15;51 Suppl 2:S183–97.
20. Barber M. *Methicillin-resistant staphylococci*. *J Clin Pathol*. 1961;(14):385–93.
21. Jack Benner E, Kayser FH. *Growing clinical significance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. 1968. pp. 741–4.
22. Shorr AF. *Epidemiology of Staphylococcal Resistance*. *Clinical Infectious Diseases*. 2007 Jan 15;45(Supplement 3):S171–6.
23. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011 [Internet]*. *Bilthoven: EARS-Net; 2012*. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>
24. European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency. *Joint technical report. The bacterial challenge: time to react. ECDC/EMA [Internet]*. 2009. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf



25. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde. Inquérito de Prevalência de Infecção 2010. Relatório. Direção-Geral da Saúde [Internet]. Available from: <http://www.dgs.pt/ms/3/pagina.aspx?codigoms=5514&back=1&codigono=00020034AAAAAAAAAAAAAAA>
26. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *EARSS Annual Report 2008*. [Internet]. Bilthoven: EARSS; 2009. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/earss-net/documents/2008_earss_annual_report.pdf
27. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Controlo de Infecção. Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção 23 de Março de 2009. Relatório. Direção-Geral da Saúde [Internet]. Available from: <http://www.dgs.pt/ms/3/pagina.aspx?codigoms=5514&back=1&codigono=00020034AAAAAAAAAAAAAAA>
28. Pina E, Paiva JA, Nogueira P, Silva MG. Prevalência de Infecção Adquirida no Hospital e do Uso de Antimicrobianos nos Hospitais Portugueses. Inquérito 2012. Direção-Geral da Saúde [Internet]. 2013 Apr. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i019020.pdf>
29. Albrich WC, Harbarth S. *Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA?* Lancet Infect Dis. 8(5):289–301.
30. Simões RR, Aires-de-Sousa M, Conceição T, Antunes F, da Costa PM, de Lencastre H. *High prevalence of EMRSA-15 in Portuguese public buses: a worrisome finding*. PLoS ONE. 2011;6(3):e17630.
31. Conceição T, Diamantino F, Coelho C, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. *Contamination of public buses with MRSA in Lisbon, Portugal: a possible transmission route of major MRSA clones within the community*. Plos ONE 2013; 8(13): e77812
32. Direção-Geral da Saúde. Campanha Nacional de Higiene das Mãos. Relatório 2010-2011. Direção-Geral da Saúde [Internet]. Available from: http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/EEDF8BFB-3F2E-423B-A4F9-17CFE5C19BF5/0/relatorio_maos_dgs.pdf
33. Müller G, Kramer A. *Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008 Jan 1;61(6):1281–7.
34. Krishna BVS, Gibb AP. *Use of octenidine dihydrochloride in meticillin-resistant Staphylococcus aureus decolonisation regimens: a literature review*. J Hosp Infect. 2010 Mar;74(3):199–203.
35. McKinnell JA, Huang SS, Eells SJ, Cui E, Miller LG. *Quantifying the impact of extra-nasal testing body sites for MRSA colonization at the time of hospital or intensive care unit admission*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013 Feb;34 (2) 161-170.



ANEXOS

Anexo 1 – Conteúdos do algoritmo clínico

A. Áreas de elevado risco de infeção associada a cuidados de saúde e de infeção por MRSA, nomeadamente unidades/serviços de medicina intensiva e unidades de hematologia:

- 1) Descontaminação universal, com banho diário com toalhetes de clorhexidina a 2%, pelo menos, nos primeiros 5 dias após admissão e higiene oral, pelo menos três vezes por dia com gluconato de clorohehidina a 0,2%, durante o internamento.

B. Em unidades de cuidados intensivos, doentes internados e doentes internados com tubo ou cânula endotraqueal devem ser submetidos a:

- 1) Higiene oral, pelo menos três vezes por dia com gluconato de clorohehidina a 0,2%, durante o internamento.

C. Procedimentos de elevado risco de infeção por MRSA, nomeadamente cirurgia eletiva:

- 1) Pelo menos, dois banhos prévios à intervenção cirúrgica, com gluconato de clorohehidina a 2%, um na véspera da cirurgia e outro no dia da cirurgia (com, pelo menos, duas horas de antecedência);
- 2) Na cirurgia do ambulatório, deve ser fornecido ao doente, na consulta prévia, esponja impregnada de gluconato de clorohehidina a 2% para a realização de higiene pré-operatória em casa.

D. Doentes de elevado risco de infeção por MRSA, nomeadamente aqueles em que se verifique, pelo menos, um destes critérios: (1) transferência de outras unidades hospitalares com estadia nessa unidade superior a 48 horas, (2) uso de antibióticos nos seis meses anteriores, (3) internamento nos seis meses anteriores, (4) hemodiálise, (5) internamento em unidades de cuidados continuados ou lar/residência de idosos, (6) presença de dispositivos invasivos, (7) presença de feridas crónicas, (8) colonização prévia por MRSA:

- 1) Pesquisa ativa (rastreamento) de portadores de MRSA, através de zaragatoa nasal e amostra de ferida cutânea (se existir), com isolamento de contacto até conhecimento do resultado;
- 2) No caso de isolamento de MRSA, descolonização com mupirocina a 2% pomada nasal (três aplicações diárias em ambas as narinas) associada a banho diário com toalhetes de clorohehidina a 2%, durante, pelo menos 5 dias;
- 3) Se o teste for negativo para MRSA, retirada de isolamento de contacto;
- 4) Uma vez efetuada a descolonização, deve monitorizar-se a sua eficácia, com realização de três rastreios de *follow-up*: o primeiro 48 horas após terminar o tratamento e os restantes com intervalos semanais;
- 5) Se a primeira descolonização falhar, pode repetir-se o procedimento, nunca se efetuando mais que dois cursos de descolonização.



E. Doentes infetados ou colonizados por MRSA ou suspeitos de ter infeção ou colonização por este agente:

- 1) Devem estar em regime de “isolamento/precauções de contacto” e em coorte de doentes, sendo estas situações claramente assinaladas no processo clínico;
- 2) Os profissionais de saúde envolvidos na prestação de cuidados a estes doentes devem adotar precauções de contacto (luvas e avental de uso único), incluindo máscara cirúrgica se risco de salpico de secreções ou fluidos, aspiração de secreções ou terapia respiratória e manter a adoção de precauções de contacto, pelo menos, até clara evidência de erradicação, idealmente, até à saída/alta do doente ou até documentação de inexistência do agente;
- 3) Todo o material usado na higiene ou nos procedimentos de diagnóstico ou tratamento destes doentes deve ser individualizado;
- 4) A deslocação entre serviços/unidades de internamento ou para a realização de exames complementares de diagnóstico destes doentes deve ser programada, antes da deslocação, de modo a reduzir os períodos de espera e deve ser assegurado, sem embargo da necessária consideração de outros critérios, que estes doentes sejam os últimos a serem deslocados e a realizar exames;
- 5) A roupa destes doentes e da sua cama deve ser mudada, antes da deslocação, para reduzir o risco de contaminação e, se possível, os doentes com infeção respiratória devem usar máscara cirúrgica;
- 6) As suas visitas devem usar medidas de proteção de contacto e ser ensinadas sobre medidas de contenção na fonte, nomeadamente higiene das mãos antes e depois de contactar com o doente e evicção do contacto com outros doentes do serviço/unidade de internamento.

ANEXO V- Tabela de Murray e Washington. [3]

Tabela de Murray e Washington

	Células Epiteliais (ampliação 10x)	Leucócitos (ampliação 10x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

Fonte: Adaptado de [3]

ANEXO VI- Norma DGS 037/ 2011 | Exames Laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco



NÚMERO: 37/2011

DATA: 30/09/2011

ATUALIZAÇÃO: 20/12/2013

ASSUNTO: Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco

PALAVRAS-CHAVE: Análises; Exames laboratoriais; Gravidez; Vigilância pré-natal

PARA: Médicos do Sistema Nacional de Saúde

CONTACTOS: Divisão de Saúde Sexual, Reprodutiva, Infantil e Juvenil (secretariado.dsr@dgs.pt)
Departamento da Qualidade na Saúde (dqs@dgs.pt)

Nos termos da alínea a) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, de 26 de janeiro, a Direção-Geral da Saúde, por proposta conjunta do Departamento da Qualidade na Saúde e da Ordem dos Médicos, emite a Norma seguinte:

1. Na vigilância da gravidez de baixo risco devem ser realizados, ou estar documentados, de acordo com a calendarização descrita em CRITÉRIOS e no ANEXO, os seguintes exames laboratoriais:
 - a) tipagem ABO e fator Rh, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - b) pesquisa de aglutininas irregulares, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - c) hemograma completo, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - d) rastreio da diabetes gestacional, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - e) rastreio da sífilis, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - f) rastreio da rubéola, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - g) rastreio da toxoplasmose, (Nível de evidência: C, grau de recomendação: II-a);
 - h) rastreio da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), (Nível de evidência: A, grau de recomendação: I);
 - i) rastreio da hepatite B, (Nível de evidência: A, grau de recomendação: I);
 - j) rastreio da bacteriúria assintomática, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
 - k) rastreio do Streptococcus β hemolítico do grupo B, (Nível de evidência: C, grau de recomendação: II-a);
 - l) rastreio do cancro do colo do útero, (Nível de evidência: B, grau de recomendação: I);
2. Os resultados dos exames laboratoriais são fornecidos à grávida, registados no Boletim de Saúde da Grávida (BSG) e no processo clínico.
3. As exceções clinicamente fundamentadas, não previstas neste documento, são registadas no BSG e no processo clínico.
4. A presente Norma é aplicada a todas as mulheres que iniciem vigilância da gravidez em janeiro de 2014.
5. É atualizada a Orientação Técnica nº 2, de 1993, da Direção-Geral da Saúde, no que diz respeito aos exames laboratoriais na gravidez de baixo risco.
6. O algoritmo clínico/árvore de decisão referente à presente Norma encontra-se em Anexo.
7. As exceções à presente Norma são fundamentadas clinicamente, com registo no processo clínico.

8. A presente Norma, atualizada com os contributos científicos recebidos durante a discussão pública, revoga a versão de 30/09/2011 e será atualizada sempre que a evolução da evidência científica assim o determine.

CRITÉRIOS DE SUPORTE À APLICAÇÃO DA NORMA

- A. A todas as grávidas deverá ser proposta a realização dos exames laboratoriais com os critérios e nos períodos que a seguir se definem. Os exames e rastreios definidos na presente Norma devem ser realizados, também, às grávidas com risco acrescido, que fazem, além disso, exames adequados ao risco identificado.
- B. Considera-se gravidez de baixo risco aquela em que não é possível identificar, após avaliação clínica de acordo com a avaliação do risco pré-natal baseada na escala de Goodwin modificada, nenhum fator acrescido de morbilidade materna, fetal e/ou neonatal.
- C. Considera-se que o risco, sendo dinâmico ao longo da gravidez, deve ser reavaliado em todas as consultas. A identificação do risco é realizada através da história clínica, exame físico e avaliações clínicas anteriores à gravidez.
- D. O esquema simplificado dos exames laboratoriais a requisitar, que a seguir se enuncia, encontra-se anexo à presente Norma e dela faz parte integrante.
- E. Tipagem ABO e fator Rh:
- deve ser realizada no 1º trimestre a todas as grávidas;
 - quando o grupo de sangue é conhecido e está bem documentado, nomeadamente em consulta pré-concepcional, deve dispensar-se a sua determinação.
- F. Pesquisa de aglutininas irregulares:
- deve ser realizada no 1º trimestre a todas as grávidas;
 - deve ser repetida entre as 24-28 semanas, mesmo nas que são Rh positivas.
- G. Hemograma completo:
- deve ser efetuado nos três trimestres da gravidez;
 - apenas deve ser realizada eletroforese da hemoglobina, nas situações previstas na Circular Normativa n.º18/DSMIA, de 7/9/2004, da Direção-Geral da Saúde “Prevenção das formas graves de hemoglobinopatias”.
- H. Rastreio da diabetes gestacional:
- Deve ser feita pesquisa de glicemia em jejum na primeira consulta de vigilância pré-natal e prova de tolerância à glicose oral (PTGO) às 24-28 semanas de gestação.
- I. Rastreio da sífilis:
- deve ser efetuado, no primeiro e terceiro trimestres de gravidez, utilizando para esse fim o VDRL (Venereal Disease Research Laboratory);
 - se VDRL positivo, a confirmação do diagnóstico deve ser realizada com um teste treponémico TPHA (Treponema pallidum haemagglutination assay) ou FTA-abs (fluorescent treponemal antibody absorption).

- J. Rastreio da rubéola:
- em mulheres com imunidade documentada na consulta pré-concepcional, ou gravidez anterior, o rastreio da rubéola não necessita ser repetido, devendo esta informação ser transcrita para o BSG e processo clínico (quando não seja ele próprio a fonte de informação);
 - em mulheres sem imunidade documentada, deve ser realizada serologia para a rubéola (IgG e IgM) no 1º trimestre. Se o resultado for o de ausência de imunidade, então deve repetir-se a serologia para a rubéola antes da realização da ecografia morfológica do 2º trimestre. Todas as puérperas não imunizadas deverão ser vacinadas com VASPR ainda na maternidade ou na consulta de revisão do puerpério, não se perdendo assim oportunidades de vacinação¹;
 - na suspeita de infeção por rubéola no 1º trimestre, a grávida deve ser referenciada para um Centro de Diagnóstico Pré-Natal.
- K. Rastreio da toxoplasmose:
- as mulheres com imunidade documentada em consulta pré-concepcional ou gravidez anterior, não necessitam repetir o exame durante a gravidez. Esta informação deve constar no BSG e no processo clínico (quando não seja ele próprio a fonte de informação);
 - deve ser realizada serologia para a toxoplasmose (IgG e IgM) no 1º trimestre de gravidez em todas as mulheres sem imunidade documentada e, caso se encontrem não imunes, deve ser repetido no 2º e 3º trimestre de gravidez;
 - na suspeita de infeção por toxoplasmose, a grávida deve ser referenciada para um Centro de Diagnóstico Pré-Natal.
- L. Rastreio da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH):
- todas as grávidas devem realizar rastreio da infeção pelo VIH, no 1º e 3º trimestre de gravidez;
 - às grávidas sem serologia documentada na altura do parto, deve ser realizado teste rápido ante ou intraparto, tal como consta da Circular Normativa n.º1/DSMIA, de 4/2/2004, da Direção-Geral da Saúde "Gravidez e vírus da imunodeficiência humana".
- M. Rastreio da hepatite B:
- deve ser realizado o rastreio da hepatite B no 1º trimestre de gravidez, incluindo as grávidas que têm história de vacinação prévia documentada, utilizando a pesquisa de AgHBs;
 - apenas as grávidas não vacinadas e cujo rastreio foi negativo no 1º trimestre, devem repetir a pesquisa do AgHBs no 3º trimestre.
- N. Rastreio da bacteriúria assintomática:
- Realizar o rastreio da bacteriúria assintomática, a todas as grávidas, no primeiro trimestre da gravidez, através do teste de urocultura com eventual teste de sensibilidade aos antibióticos.
- O. Rastreio do Streptococcus β hemolítico do grupo B:
- deve ser realizado a todas as grávidas entre as 35 e 37 semanas, através da colheita de uma amostra única do 1/3 externo da vagina e ano-retal;

- ii. não necessitam deste rastreio as grávidas a quem foi isolado *Streptococcus* β hemolítico do grupo B na urina (bacteriúria assintomática ou infeção urinária), durante a gestação em curso, nem naquelas com história anterior de sépsis neonatal, por *Streptococcus* β hemolítico do grupo B;
 - iii. têm indicação para profilaxia intraparto todas as grávidas a quem for detetado *Streptococcus* β hemolítico do grupo B através da colheita referida na alínea i) e nos casos referidos na alínea ii).
- P. Rastreio do cancro do colo do útero:
- Q. Realizar a citologia cervical no 1º trimestre, a todas as grávidas com mais de 25 anos, que nunca tenham realizado o exame ou que o tenham feito há mais de 3 anos, após dois exames anuais negativos.

AVALIAÇÃO

- A. A avaliação da implementação da presente Norma é contínua, executada a nível local, regional e nacional, através de processos de auditoria interna e externa.
- B. A parametrização dos sistemas de informação para a monitorização e avaliação da implementação e impacte da presente Norma é da responsabilidade das administrações regionais de saúde e das direções dos hospitais.
- C. A efetividade da implementação da presente Norma nos cuidados de saúde primários e nos cuidados hospitalares e a emissão de diretivas e instruções para o seu cumprimento é da responsabilidade dos conselhos clínicos dos agrupamentos de centros de saúde e das direções clínicas dos hospitais.
- D. A Direção-Geral da Saúde, através do Departamento da Qualidade na Saúde, elabora e divulga relatórios de progresso de monitorização.
- E. A implementação da presente Norma é monitorizada e avaliada através dos seguintes indicadores:
 - i. % de grávidas do primeiro trimestre, vigiadas, com prescrição de exames laboratoriais de acordo com a Norma;
 - ii. % de grávidas do segundo trimestre, vigiadas, com prescrição de exames laboratoriais de acordo com a Norma;
 - iii. % de grávidas do terceiro trimestre, vigiadas, com prescrição de exames laboratoriais laboratoriais de acordo com a Norma;
 - iv. valor da prescrição de exames laboratoriais realizados por grávida vigiada.

FUNDAMENTAÇÃO

- A. A gravidez constitui uma ocasião privilegiada de contacto com os serviços de saúde e um momento único para avaliação do estado de saúde da mulher.
- B. Os exames laboratoriais a requisitar no decurso das consultas de vigilância da gravidez, têm como objetivo rastrear, prevenir ou tratar situações passíveis de colocar em risco a saúde materna e/ou fetal ou perinatal.
- C. No início da gravidez importa, assim, verificar os achados clínicos da consulta pré-concepcional.

D. Tipagem ABO e fator Rh:

A tipagem segura dos grupos sanguíneos ABO e RhD assumem um papel muito importante na mulher em idade fértil e na grávida em particular. As mulheres RhD negativas devem ser informadas das medidas de prevenção da aloimunização RhD^{2,3}.

E. Pesquisa de aglutininas irregulares:

A presença de antigénios antieritrocitários, nomeadamente anti-D, mas também anti-C, anti-Kell e anti-E, estão associados à doença hemolítica do recém-nascido, e são passíveis de intervenção fetal².

F. Hemograma completo:

A anemia grave da grávida está associada a um aumento da probabilidade de ocorrência de morte intrauterina fetal, de baixo peso à nascença e de parto prematuro⁴. A causa mais frequente de anemia na gravidez é a deficiência em ferro². Quando a família da mulher é proveniente de zonas de alta prevalência de hemoglobinopatias, ou quando o volume globular médio (VGM) inferior a 80 e / ou (HGM) inferior a 27, deve ser realizado o rastreio das hemoglobinopatias na mãe². Se positivo, o estudo deve ser realizado também no progenitor e ser feita referência para consulta de aconselhamento em diagnóstico pré-natal.

Vários estudos têm demonstrado uma associação inversa entre a hemoglobina e hematócrito (do 2º e 3º trimestre) e o peso de nascimento. A elevação destes 2 parâmetros está associada a uma maior incidência de restrição de crescimento fetal, pré-eclâmpsia e morbilidade perinatal^{5 e 6}. A trombocitopenia materna (PLT <150x10⁹/L) ocorre em 10 % das gestações, sendo mais frequente no 3ºtrimestre. Geralmente associada a uma situação benigna (trombocitopenia gestacional) pode surgir num contexto de doença hipertensiva da gravidez (Pré-eclâmpsia) ou patologia imunológica. O seu achado deve ser enquadrado na situação clínica da mulher e, dependendo desta e dos valores encontrados, poderá ser necessário proceder a uma conduta específica pré e intra-parto⁷.

G. Rastreio da diabetes gestacional:

O controlo da glicemia durante a gravidez diminui a ocorrência de complicações maternas e a morbilidade perinatal⁸. Este benefício é tanto maior quanto mais precocemente for realizado o diagnóstico e iniciado o controlo metabólico⁹. O aumento na prevalência de obesidade na população jovem feminina tem tido como resultado um maior número de casos de Diabetes tipo II não diagnosticada antes da gravidez¹⁰. Na primeira visita pré natal deve ser pedida uma glicemia em jejum como estratégia de diagnóstico e deteção de anomalias da glicemia no decurso da gravidez. A PTGO nunca deve ser pedida como rotina antes das 24-28 semanas^{10,11 e 12}.

H. Rastreio da sífilis:

Em Portugal, os casos de sífilis congénita reportados têm diminuído ao longo dos últimos 10 anos, porém, constituem, ainda, um número mais elevado que no resto da Europa¹³.

Está bem demonstrada a importância de realizar o rastreio da sífilis na vigilância antenatal. Com efeito, o tratamento durante a gravidez diminui as complicações fetais e neonatais que estão associadas a esta doença 2 e 3. Assim, preconiza-se a sua realização duas vezes na gravidez, o mais precocemente possível e anteparto^{14 e 15}.

I. Rastreio da rubéola:

É consensual a importância do rastreio do estado imunitário em relação à rubéola e a vacinação na fase pré-concepcional. Esta deve ser considerada a medida “excelente”¹⁶. Quando o rastreio é realizado desta forma e se conhece o estado imunitário da grávida, não é necessário repetir o exame no início da gravidez, tal como preconizado nesta Norma¹⁷. O objetivo de rastrear para a rubéola nesta fase é a possibilidade de vacinar no pós parto e proteger futuras gravidezes². As grávidas não imunes no 1º trimestre devem repetir o exame no início do 2º trimestre (entre as 18-20 semanas), para assegurar que não ocorreu seroconversão materna em tempo útil, ou seja, antes do prazo legal para interrupção de gravidez.

J. Rastreio da toxoplasmose:

A toxoplasmose é considerada uma infeção rara mas potencialmente muito grave¹⁸. Na toxoplasmose a gravidade da infeção fetal por transmissão vertical diminui ao longo da gravidez, em sentido contrário à probabilidade de transmissão vertical que aumenta à medida que progride a gestação¹⁹. É, assim, preconizado, para as mulheres sem imunidade, rastrear a toxoplasmose cada três meses, tendo em conta que, desta forma se aumenta a probabilidade de realizar diagnósticos precoces e com isso possibilitar o início da terapêutica²⁰. Nas mulheres imunocompetentes, com infeção a toxoplasmose antes da conceção, o risco de reinfeção é muito raro. Existem poucos dados sobre o estado imunitário das mulheres em Portugal para a toxoplasmose.

K. Rastreio da infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH):

Na infeção pelo VIH o risco de transmissão perinatal sem intervenção é de 15-40%, diminuindo para menos de 2% quando se realiza terapêutica durante a gravidez e se adotam medidas de prevenção no parto e se inibe a amamentação². É, assim, consensual a importância do diagnóstico precoce na gravidez, para iniciar terapêutica materna e diminuir o risco de transmissão materno-fetal²¹.

L. Rastreio da hepatite B:

O rastreio da hepatite B na grávida iniciou-se em 1992²². Identificando as mulheres AgHBs positivas é possível uma intervenção precoce e eficaz no recém-nascido que tem indicação para administração de imunoglobulina específica e vacina nas primeiras 12 - 24 horas de vida, o que reduz o seu risco de infeção em 95% dos casos^{1 e 2}. A vacinação universal contra a hepatite B em Portugal condicionou o controlo e diminuição desta infeção¹⁶. A taxa de cobertura de recém-nascidos, crianças e adolescentes é elevada (> 95%)²³. Atualmente Portugal pode ser considerado um país de prevalência baixa, com uma percentagem estimada de portadores AgHBs de 1%. Contudo, existem subgrupos em que a prevalência é mais elevada, como sejam, migrantes (5%) e utilizadores de drogas endovenosas²⁴. Rastrear apenas as mulheres de risco pode levar a não diagnosticar 50% das mulheres infectadas com o vírus da hepatite B².

M. Rastreio da bacteriúria assintomática:

A urocultura constitui na gravidez o teste de referência para o diagnóstico da bacteriúria assintomática. A sua incidência é de 2% a 10% na grávida. Quando não tratada está associada a pielonefrite (até 30%). O diagnóstico e terapêutica atempados reduzem estas complicações bem como diminuem as situações de baixo-peso ao nascer^{2 e 25}.

N. Rastreio do Streptococcus β hemolítico do grupo B:

O rastreio universal do Streptococcus β hemolítico do grupo B permite identificar as grávidas em risco de ter um recém-nascido com sépsis neonatal. Nas mulheres em que foi identificada a colonização por Streptococcus β hemolítico do grupo B, deve ser realizada profilaxia intraparto ²⁶.

O. Rastreio do cancro do colo do útero:

A gravidez e o puerpério são uma oportunidade para realizar o rastreio da neoplasia do colo do útero, nas mulheres que o não realizam habitualmente, de acordo com o Programa Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Oncológicas ^{27 e 28}.

APOIO CIENTÍFICO

- A. A presente Norma foi elaborada pelo Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde e pelo Conselho para Auditoria e Qualidade da Ordem dos Médicos, através dos seus Colégios de Especialidade, ao abrigo do protocolo entre a Direção-Geral da Saúde e a Ordem dos Médicos, no âmbito da melhoria da Qualidade no Sistema de Saúde.
- B. A elaboração da proposta da presente Norma teve o apoio científico de Lisa Ferreira Vicente (coordenação científica) e Divisão de Saúde Sexual, Reprodutiva, Infantil e Juvenil da Direção-Geral da Saúde.
- C. Foram subscritas declarações de interesse de todos os peritos envolvidos na elaboração da presente Norma.
- D. A presente Norma tomou em consideração os contributos sustentados cientificamente, recebidos durante o período de discussão pública, foi sujeita a uma avaliação científica e a uma contextualização em termos de custo-efetividade, quer por parte do Departamento da Qualidade na Saúde quer pela Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas, criada por Despacho n.º 12422/2011, do Secretário de Estado Adjunto do Ministro da Saúde, de 8 de setembro, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 181, de 20 de setembro de 2011 e alterada pelo Despacho n.º 7584/2012, do Secretário de Estado Adjunto do Ministro da Saúde, de 23 de maio, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 107, de 1 de junho de 2012, que procedeu à sua validação científica final.
- E. A avaliação científica feita pelo Departamento da Qualidade na Saúde teve o apoio científico do Professor Doutor Henrique Luz Rodrigues, responsável pela supervisão e revisão científica das Normas Clínicas.

APOIO EXECUTIVO

Na elaboração da presente Norma o apoio executivo foi assegurado pela Divisão de Saúde Sexual, Reprodutiva, Infantil e Juvenil e Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação, Orientações Técnicas nº 10. Circular Normativa nº 08/DT de 21/12/2005.
- ² National Institute for Health and Clinical Excellence. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Antenatal care routine care for the healthy pregnant woman. 2nd edition London: Andrew Welsh; 2008.
- ³ Di Mario S et al. (2005). What is the effectiveness of antenatal care? (Supplement) Copenhagen, WHO Regional Office for Europe. (Health Evidence Network report; <http://www.euro.who.int/Document/E87997.pdf>, accessed 28 December 2005).
- ⁴ Reveiz L, Gyte GML, Cuervo LG. Treatments for iron-deficiency anaemia in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews 2007, Issue 2. Art. No.: CD003094. DOI: 10.1002/14651858.CD003094.pub2.
- ⁵ Amburgey OA, Ing E, Badger GJ, Bernstein IM. Maternal hemoglobin concentration and its association with birth weight in newborns of mothers with preeclampsia. J Maternal Fetal Neonatal Med 2009 September; 22(9):740-744. doi:10.3109/14767050902926947.
- ⁶ Steer PJ. Maternal hemoglobin concentration and birth weight. Am J Clin Nutr 2000; 71(suppl):1285S-7S. (Downloaded from www.ajcn.org on 13, 2012).
- ⁷ Khellaf M, Loustau V, Bierling P, Michel M, Godeau B. Thrombocytopenia and pregnancy. Rev Med Interne 2012 Aug; 33(8):446-52. Epub 2012 Jun 27.
- ⁸ Crowther CA, Hiller JE, Moss jr, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Australian Carbohydrate Intolerance Study in Pregnant Women (ACHOIS). Effect of Treatment of Gestational Diabetes on Pregnancy Outcomes. New England Journal of Medicine 2005 June 16; 352: 2477-2486.
- ⁹ The Hapo Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. New England Journal of Medicine 2008 May 8; 358:1991-2002.
- ¹⁰ International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. Diabetes Care 2010 March; 33(3): 676-682.
- ¹¹ Direção-Geral da Saúde. Norma n.º 7/2011-Diagnóstico e Conduta na Diabetes Gestacional. 31 /1/2011.
- ¹² Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo (SPEDM), Sociedade Portuguesa de Diabetologia (SPD), Sociedade Portuguesa de Obstetrícia e Medicina Materno-Fetal (SPOMMF), Secção de Neonatologia da Sociedade Portuguesa de Pediatria. Relatório de Consenso sobre a Diabetes e Gravidez. Janeiro de 2011.
- ¹³ European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe, 1990-2009. Stockholm: ECDC; 2011.
- ¹⁴ Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. Recommendations and reports 2010 December 17; 59 (RR-12).
- ¹⁵ Viroj Wiwanitkit. Screening for syphilis in pregnancy: which is the proper method? Arch Gynecol Obstet 2007; 276:629-631.

- ¹⁶ Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. Avaliação do programa nacional de vacinação e melhoria do seu custo efectividade: 2º Inquérito Serológico Nacional: Portugal Continental 2001- 2002. Lisboa: DGS; 2004.
- ¹⁷ American Academy of Pediatrics, American College of Obstetricians and Gynecologists. Guidelines for perinatal care. 6ª edição: AAP - ACOG; 2007.
- ¹⁸ Di Mario S, Basevi V, Gagliotti C, Spettoli D, Gori G, D'Amico R, Magrini N. Prenatal education for congenital toxoplasmosis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2009, Issue1. Art. No.: CD 006171. DOI: 10.1002/14651858. CD006171.pub2.
- ¹⁹ Peyron F, Wallon M, Liou C, Garner P. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews 1999, Issue 3. Art. No.: CD001684. DOI: 10.1002/14651858.CD001684.
- ²⁰ Haute Autorité de Santé. Suivi et orientation des femmes enceintes en fonction des situations à risque identifiées. Recommandation pour la pratique clinique. HAS; 2007.
- ²¹ Centers for Disease Control and Prevention. Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. MMWR. 2006 September 22; 55 (RR14): 1-17.
- ²² Direção-Geral da Saúde. Determinação sistemática do AgHBs nas grávidas e imunização dos recém-nascidos filhos de mães portadoras. Circular Normativa nº 6/DTP de 28/07/92.
- ²³ Direção-Geral da Saúde. Direção de Serviços de Prevenção e Controlo da Doença (DSPCD). PNV-Avaliação 2011. Boletim de Vacinação. Março de 2012; nº 1:1-2.
- ²⁴ Marinho R, Lavanchy D. Burden and Prevention of Viral Hepatitis in Portugal. Viral Hepatitis Prevention Board 2011 June; 19 (2).
- ²⁵ Smaill F, Vazquez JC. Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews 2007, Issue 4. Art. No.: CD000490. DOI:10.1002/14651858.CD000490.pub2.
- ²⁶ Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC, 2010. MMWR 2010; 59 (Nº. RR-10):1-32.
- ²⁷ Ministério da Saúde. Plano Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Oncológicas 2007/2010.
- ²⁸ Plano Oncológico Nacional 2001-2005. D.R. Iª Série - B nº 190, 17/8/2001, 5241-7.



Francisco George
Diretor-Geral da Saúde

ANEXOS

Anexo I: Quadros, tabelas e gráficos

1º Trimestre	
<13 semanas	
1. Citologia cervical – Conforme recomendações do Plano Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Oncológicas 2007-2010 para as mulheres não grávidas	
2. Tipagem ABO e fator Rh	8. Serologia Toxoplasmose - IgG e IgM (se desconhecido ou não imune em consulta preconcepcional)
3. Pesquisa de aglutininas irregulares (teste de Coombs indireto)	9. Ac VIH 1 e 2
4. Hemograma completo	10. AgHBs
5. Glicémia em jejum	11. Urocultura com eventual TSA
6. VDRL	
7. Serologia Rubéola - IgG e IgM (se desconhecido ou não imune em consulta preconcepcional)	
2º Trimestre	
18-20 semanas	
12. Serologia Rubéola (IgG e IgM, nas mulheres não imunes)	
24-28 semanas	
13. Hemograma completo	16. Pesquisa de aglutininas irregulares (teste de Coombs indireto)
14. PTGO c/ 75g (colheita às 0h, 1h e 2 horas)	
15. Serologia Toxoplasmose - IgG e IgM (não imunes)	
3º Trimestre	
32 -34 Semanas	
17. Hemograma completo	20. Ac. VIH 1 e 2
18. VDRL	21. AgHBs (as grávidas não vacinadas e cujo rastreio foi negativo no 1º trimestre)
19. Serologia Toxoplasmose - IgG e IgM (nas mulheres não imunes)	
35-37 Semanas	
22. Colheita (1/3 externo da vagina e ano-retal) para pesquisa de <i>streptococcus</i> β hemolítico do grupo B	

ANEXO VII- Tabela de Quantificação de BAAR [3]

Tabela de quantificação de BAAR. [3]

Código de Leitura	Número de BAAR observados (ampliação de 1000x)
Não se observaram BAAR	0/100 Campos
1-9/ 100 Campos	1-9/ 100 Campos
1+	10-99/ 100 Campos
2+	1-10/ Campo
3+	>10/ Campo

BAAR, Bacilos ácido-álcool resistentes

ANEXO VIII- Relatório do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)
relativo à Identificação e Antibiograma de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*



Departamento Doenças Infecciosas
Unidade Referência e Vigilância Epidemiológica
Laboratório Nacional de Referência de Infecções Respiratórias - LNR de Micobactérias
Responsável técnico: Rita Macedo

Nº Requisição: 320200
Data de entrada: 06/07/2016 Data de saída: 25/07/2016
Data de colheita: 06/07/2016
Local da colheita: Externa
Data de nascimento: 29/09/1962

Médico: Medico Assistente
Serviço:

Relatório

Análise	Resultado
Estirpe	
Antibiograma 1ª Linha	
Método: Proporções em meio líquido	
Isoniazida (0,1 µg/mL)	Sensível
Etambutol (5,0 µg/mL)	Sensível
Rifampicina (1,0 µg/mL)	Sensível
Pirazinamida (100,0 µg/mL)	Sensível
Estreptomicina (1,0 µg/mL)	Resistente
Identificação de micobactérias do complexo <i>M. tuberculosis</i>	Positivo
Método: Imunocromatografia	

Rita Macedo
Técnico Superior

ANEXO IX – IT.SPC.032.00 Exame Direto a Fresco com contraste negativo por tinta-da-china



1. Objetivo

Descrever a técnica de execução de exame a fresco com contraste negativo por Tinta da China.

2. Âmbito

Aplica-se ao Serviço de Patologia Clínica.

3. Definições

Câmara húmida - caixa de Petri com papel de filtro ou algodão embebido em água ou soro fisiológico, destinada a criar um ambiente húmido.

4. Descrição

4.1. Princípio

A coloração por Tinta da China é utilizada para evidenciar a presença de *Cryptococcus spp.* em amostras biológicas (nomeadamente no líquido cefalorraquídeo) ou a partir de colónias em cultura.

A Tinta da China é utilizada como material contrastante: a cápsula polissacárida do *Cryptococcus ssp.* exclui a tinta, criando um halo transparente ao redor da célula fúngica.

4.2 Material e equipamento

- Ansas;
- Câmara húmida;
- Centrífuga;
- Lamelas;
- Lâminas;
- Pipetas;
- Soro fisiológico;
- Tinta da China;
- Tubos de centrifuga.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.032.00				03.11.2014	1/2

4.3. Procedimento Técnico

De acordo com o tipo de amostra:

4.3.1 - Amostras biológicas líquidas ou cultura em meio líquido

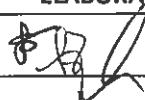


1. Com uma pipeta colocar a amostra (ou parte dela) num tubo de centrifuga;
2. Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos;
3. Colocar uma gota de Tinta da China e uma gota de soro fisiológico num tubo e homogeneizar;
4. Retirar uma gota do sedimento usando uma pipeta e colocar no tubo com a Tinta da China diluída, homogeneizando em seguida;
5. Caso seja necessário uma preparação com tonalidade mais clara, juntar uma pequena gota de soro fisiológico à preparação descrita no ponto 4. Se for necessária uma tonalidade mais escura, adicionar uma pequena gota de Tinta da China à mesma preparação;
6. Da preparação anterior retirar uma pequena gota, usando uma pipeta, e colocar sobre uma lâmina;
7. Sobrepor cuidadosamente uma lamela (sem formar bolhas);
8. Colocar em câmara húmida.

4.3.2 - Colónias em meio de cultura sólido

1. Colocar uma gota de Tinta da China e uma gota de soro fisiológico num tubo e homogeneizar;
2. Retirar uma porção da colónia a estudar com uma ansa e colocar no tubo com a Tinta da China diluída, homogeneizando em seguida;
3. Caso seja necessário uma preparação com tonalidade mais clara, juntar uma pequena gota de soro fisiológico à preparação descrita no ponto 2. Se for necessária uma tonalidade mais escura, adicionar uma pequena gota de Tinta da China à mesma preparação;
4. Da preparação anterior retirar uma pequena gota, usando uma pipeta, e colocar sobre uma lâmina;
5. Sobrepor cuidadosamente uma lamela (sem formar bolhas);
6. Colocar em câmara húmida.

5. Bibliografia

"Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia", Ministério da Saúde, Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, 2004.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.032.00				03.11.2014	2/2

ANEXO X – Orientação DGS 006/2010| *Enterobacteriaceae* produtoras da carbapenemase New Delhi metalo- β -lactamase I (NDM-I)

ORIENTAÇÃO DA DIRECÇÃO-GERAL DA SAÚDE

Direcção-Geral da Saúde
www.dgs.pt



Ministério da Saúde

NÚMERO: 006/2010

DATA: 04/10/2010

ASSUNTO: *Enterobacteriaceae* produtoras da carbapenemase *New Delhi* metalo- β -lactamase 1 (NDM-1)
PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos
PARA: Laboratórios do Sistema Nacional de Saúde
CONTACTOS: Departamento da Qualidade na Saúde; cristinacosta@dgs.pt

Nos termos da alínea c) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 66/2007, de 29 de Maio, na redacção dada pelo Decreto Regulamentar nº 21/2008, de 2 de Dezembro, emite-se a Orientação seguinte:

1. Os laboratórios de microbiologia, sempre que identifiquem uma estirpe bacilo Gram negativo resistente ou de susceptibilidade diminuída aos carbapenemos, deverão confirmar a concentração inibitória mínima (CMI) ao Imipenemo por Etest, assim como a produção de uma metalo- β -lactamase por inibição com o EDTA, utilizando a tira dupla de Etest (Imipenemo+EDTA).
2. Em caso de resultado positivo, o laboratório deverá preservar a estirpe e proceder ao seu envio para o Laboratório Nacional de Referência de Resistência aos Antimicrobianos, no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Esta entidade irá assegurar a pesquisa do gene de resistência por sequenciação, o que, confirmando-se, levará à caracterização do gene de resistência, à avaliação da extensão da sua disseminação em Portugal e à detecção/caracterização de clones epidémicos.
3. A avaliação da extensão da sua disseminação em Portugal será divulgada pela Direcção-Geral da Saúde.
4. Face à suspeita de infecção ou colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras da carbapenemase *New Delhi* metalo- β -lactamase (NDM-1), há que aplicar de imediato as medidas preconizadas pela Comissão de Controlo de Infecção, nomeadamente:
 - a) Implementar precauções básicas, de que é exemplo o reforço da higiene das mãos, e precauções de contacto desde a admissão, de acordo com o estabelecido no Programa Nacional de Controlo de Infecção (www.dgs.pt – Microsite do Controlo de Infecção);
 - b) Efectuar rastreio com zaragatoa rectal a todos os doentes “críticos”, designadamente que tenham efectuado viagens aos países afectados ou tenham tido contacto com casos suspeitos.
5. O laboratório que detecta uma estirpe suspeita deve notificar, de imediato, as seguintes entidades:
 - a) o requisitante;
 - b) a Comissão de Controlo de Infecção (CCI), em caso de laboratório hospitalar;
 - c) a Direcção-Geral da Saúde (cristinacosta@dgs.pt).
6. As CCI, perante a situação, devem investigar se a estirpe foi isolada em doente proveniente de país afectado ou provindo de outra instituição hospitalar.

FUNDAMENTAÇÃO

A emergente resistência das bactérias aos antimicrobianos é global e pode afectar todas as bactérias e classes de antibióticos disponíveis. Esta situação não é exclusiva de estirpes patogénicas, surgindo também em estirpes não patogénicas, comensais, que têm a possibilidade de transferir o mecanismo de resistência para outras bactérias. A disseminação de estirpes multirresistentes faz-se através de indivíduos colonizados ou infectados, a uma escala planetária. Alguns dos antibióticos de reserva, nomeadamente os carbapenemos, já são ineficazes em muitas situações. Em Portugal, a resistência aos carbapenemos é, em estirpes invasivas de *K. pneumoniae*, inferior a 1% e, na *Pseudomonas aeruginosa*, atinge os 17,7%.

Na Europa, foi descrita recentemente a presença de uma nova enzima, a *New Delhi* Metallo- β -lactamase 1 (NDM-1), que confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenemos. Esta enzima foi detectada em 2008, numa estirpe de *K. pneumoniae*, em doentes tratados num hospital de *New Delhi*, na Índia. Desde então, tem sido identificada em várias espécies da família das *Enterobacteriaceae*, assim como na *Acinetobacter baumannii*. Estas bactérias foram encontradas no Reino Unido, Índia, Paquistão, Bangladesh, Austrália, Estados Unidos da América, Canadá, Alemanha, Holanda, Bélgica e França.

O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) está a monitorizar a situação, conjuntamente com as autoridades de saúde pública europeias e, naturalmente, com a Direcção-Geral da Saúde.

BIBLIOGRAFIA

- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a New Metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase gene carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53 (12): 5046-54.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological update on NDM-1 “superbug” threat [online]. 2010 [consultado em 17 Agosto 2010]. Disponível em: http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvice/Lists/ECDC%20Reviews/ECDC_DispForm.aspx?List=512ff74f%2D77d4%2D4ad8%2Db6d6%2Dbf0f23083f30&ID=931&RootFolder=%2Fen%2Factivities%2Fsciadvice%2FLists%2FECDC%20Reviews.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, e tal. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. [online]. 2010 [consultado em 17 Agosto 2010]. Disponível em: [http://thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(10\)70143-2/abstract](http://thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(10)70143-2/abstract).



Francisco George
Director-Geral da Saúde

NÚMERO: 004/2013
DATA: 08/08/2013
ATUALIZAÇÃO: 13/11/2015

ASSUNTO: Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos
PALAVRAS-CHAVE: Resistências aos Antimicrobianos
PARA: Todos os laboratórios do Sistema de Saúde e Grupos de Coordenação Local e Regional do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos
CONTACTOS: Departamento da Qualidade na Saúde (dqs@dgs.pt)

Nos termos da alínea a) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, de 26 de janeiro, por proposta conjunta do Departamento da Qualidade na Saúde e da Ordem dos Médicos, a Direção-Geral da Saúde emite a seguinte:

NORMA

1. A dinamização do Sistema de Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos tem de radicar na notificação imediata de microrganismos “alerta” e na notificação mediata de microrganismos “problema”. Assim:

a) Tem de ser obrigatória a notificação à Direção-Geral da Saúde (DGS) e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) dos microrganismos “alerta”, por todos os laboratórios de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde, da seguinte forma:

- (i) A notificação de microrganismos “alerta” tem de ocorrer num prazo máximo de 48 horas;
- (ii) Devem ser considerados microrganismos “alerta”⁽¹⁾:
 - a. *Staphylococcus aureus* com resistência à vancomicina (VRSA);
 - b. *Staphylococcus aureus* com resistência ao linezolid;
 - c. *Staphylococcus aureus* com resistência à daptomicina;
 - d. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* com resistência ao linezolid;
 - e. *Enterobacteriaceae* com suscetibilidade intermédia ou resistência aos carbapenemes e/ou presumíveis produtoras de carbapenemases;

da plataforma já utilizada pelo EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) disponível em www.insa.pt;

- (iv) O envio dos resultados dos microrganismos “problema” ao INSA tem de ser efetuado de acordo com o estipulado para cada microrganismo e com o seu significado epidemiológico, indicado pela plataforma já utilizada pelo EARS-Net;
- (v) O envio dos microrganismos “problema” ao INSA, em cultura pura deve ser efetuado apenas para uma amostragem com significado epidemiológico e com caráter prospetivo, a indicar, antecipadamente, pelo INSA.

2. Laboratórios nacionais:

- a) Todos os laboratórios têm obrigatoriamente de se registar na Direção-Geral da Saúde (DGS) e no [Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge](http://www.insa.pt) (INSA), mediante o preenchimento e devolução do “formulário de registo do laboratório”, solicitado através do endereço rnlra@insa.min-saude.pt;
 - b) Todos os laboratórios nacionais participantes no programa EARS-Net e, por conseguinte, já integrados neste sistema de vigilância epidemiológica devem utilizar os códigos existentes e os restantes serão informados dos respetivos códigos, pelo INSA;
 - c) A notificação e o envio da estirpe devem ser da responsabilidade do diretor técnico do laboratório, ou de quem detenha função equivalente;
 - d) A notificação é obrigatória e realizada por via eletrónica pelo laboratório, utilizando o formato já utilizado para o EARS-Net;
 - e) A notificação tem de ser enviada para o endereço rnlra@insa.min-saude.pt
3. Ao INSA compete verificar e registar a receção da notificação e dos microrganismos e informar a receção das mesmas aos notificadores. A DGS e o INSA tomam conhecimento da notificação dos microrganismos “alerta” e “problema” em simultâneo.
4. O INSA tem de informar a DGS e o laboratório de origem sobre a confirmação do resultado do microrganismo “alerta” isolado e, se for caso disso, dos mecanismos de resistência envolvidos, num prazo indicativo de um mês, máximo de dois meses, após receção do isolado.

5. O INSA tem de enviar à DGS os resultados acumulados sobre os microrganismos “problema” com uma periodicidade não superior a doze meses;
6. A DGS tem de promover, nos casos relevantes, o contato com o laboratório de microbiologia e com os Grupos de Coordenação Local do PPCIRA (GCL – PPCIRA) da unidade de saúde de origem para que, localmente:
 - a) Exista notificação interna da deteção do microrganismo para o Diretor Clínico e Enfermeiro-Diretor;
 - b) Sejam adotadas as medidas adequadas para o controlo e prevenção de transmissão cruzada;
 - c) Seja disponibilizada a colaboração técnico-científica que a unidade de saúde possa necessitar.
7. Adicionalmente ao indicado nos pontos 3, 4, 5 e 6 da presente Norma, a DGS e o INSA têm de:
 - a) INSA:
 - i. Realizar avaliação externa da qualidade dos procedimentos laboratoriais, dando relato a cada laboratório e à DGS de inconformidades verificadas;
 - ii. Manter lista de laboratórios inscritos na rede de vigilância e de laboratórios notificadores, enviando lista atualizada à DGS no início de cada ano;
 - iii. Manter lista de microrganismos alerta notificados e confirmados laboratorialmente, e do seu mecanismo de resistência, por instituição, enviando lista atualizada à DGS com periodicidade não superior a um mês;
 - b) DGS:
 - i. Realizar relatórios anuais sobre microrganismos “problema” e microrganismos “alerta” e sobre uso de antimicrobianos em cada unidade de saúde [unidade local de saúde (ULS), centros hospitalares ou hospitais];
 - ii. Enviar a cada conselho de administração, Grupo de Coordenação Local do PPCIRA e laboratório de microbiologia o relatório sobre o seu hospital/centro hospitalar/unidade local de saúde (ULS); e
 - iii. Enviar ao conselho diretivo da administração regional de saúde (ARS) e Grupo de Coordenação Regional do PPCIRA os dados dos hospitais da respetiva ARS.



DGS desde
1899
Direção-Geral da Saúde



NORMA |
da Direção-Geral da Saúde

8. A publicação de dados por terceiros obtidos no âmbito deste programa de vigilância epidemiológica tem de ser obrigatoriamente autorizada, por escrito, previamente, pelo INSA e pela DGS.
9. Qualquer exceção à Norma é fundamentada no sítio do Programa Nacional para Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (ppcira@dgs.pt).

10. O instrumento de auditoria clínica

Instrumento de Auditoria Clínica				
Norma "Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos"				
Unidade:				
Data: ___/___/___		Equipa auditora:		
1: Notificação Obrigatória: Microrganismos "Alerta"				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que a nível do laboratório de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde a notificação imediata obrigatória dos microrganismos "alerta" à Direção-Geral da Saúde (DGS) e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), ocorre num prazo de 48 horas				
Existe evidência de que na notificação obrigatória de microrganismos "alerta" são considerados os seguintes: <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência à vancomicina (VRSA); <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência ao linezolid; <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência à daptomicina; <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> com resistência ao linezolid; <i>Enterobacteriaceae</i> com suscetibilidade intermédia ou resistência aos carbapenemes e/ou presumíveis produtoras de carbapenemases; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com resistência à colistina; <i>Acinetobacter</i> spp. com resistência à colistina				
Existe evidência de que o laboratório de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde notifica os microrganismos "alerta", independentemente do tipo de amostras em que foram isolados, sejam os exames destinados ao diagnóstico etiológico da infeção, ao estudo de colonização ou ainda a avaliação ambiental em unidades de saúde				
Existe evidência de que o laboratório de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde conserva o microrganismo isolado e envia-o, em cultura pura, ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), a fim de ser validado o padrão de resistência e, sempre que se justifique, estudado o respetivo mecanismo de resistência				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
2: Notificação Obrigatória: Microrganismos "Problema"				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que a nível do laboratório de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde a notificação imediata obrigatória à Direção-Geral da Saúde (DGS) e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), dos microrganismos "problema" ocorre com uma periodicidade de 3 meses, no máximo				
Existe evidência de que na notificação obrigatória dos microrganismos "problema" são incluídos os seguintes microrganismos de origem invasiva [sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR)]: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ver Anexo I, Quadro 1); <i>Acinetobacter</i> spp. (ver Anexo I, Quadro 2); <i>Enterobacteriaceae</i> (ver Anexo I, Quadro 3); <i>Staphylococcus aureus</i> (ver Anexo I, Quadro 4); <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> (ver Anexo I, Quadro 5); <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ver Anexo I, Quadro 6), nos termos da presente Norma				
Existe evidência de que na notificação obrigatória dos microrganismos "problema" é incluído o <i>Clostridium difficile</i>				
Existe evidência de que o laboratório de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde notifica os microrganismos "problema", independentemente da sua suscetibilidade aos antimicrobianos que constam na "folha de registo de dados" da plataforma já utilizada pelo EARS-Net (<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>) disponível em www.insa.pt				
Existe evidência de que o laboratório de patologia clínica/microbiologia do				

sistema de saúde envia os resultados dos microrganismos “problema” ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), de acordo com o estipulado para cada microrganismo e com o seu significado epidemiológico, indicado pela plataforma já utilizada pelo EARS-Net				
Existe evidência de que o laboratório de patologia clínica/microbiologia do sistema de saúde envia os microrganismos “problema” ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em cultura pura, efetuado apenas para uma amostragem com significado epidemiológico e com caráter prospetivo, a indicar, antecipadamente, pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
3: Outras Responsabilidades dos Laboratórios Nacionais				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que o laboratório se regista na Direção-Geral da Saúde (DGS) e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), mediante o preenchimento e devolução do “formulário de registo do laboratório”, solicitado através do endereço rnlvra@insa.min-saude.pt				
Existe evidência de que o laboratório participante no programa EARS-Net e, por conseguinte, já integrado neste sistema de vigilância epidemiológica, utiliza os códigos existentes				
Existe evidência de que a nível do laboratório a notificação e o envio da estirpe são da responsabilidade do diretor técnico do laboratório, ou de quem detenha função equivalente				
Existe evidência de que a nível do laboratório a notificação é obrigatória e realizada por via eletrónica pelo laboratório, utilizando o formato já utilizado para o EARS-Net				
Existe evidência de que o laboratório envia a notificação para o endereço rnlvra@insa.min-saude.pt				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
4: INSA				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) verifica e regista a receção da notificação de microrganismos “alerta” e “problema”				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) toma conhecimento da notificação dos microrganismos “alerta”, em simultâneo com a Direção-Geral da Saúde (DGS)				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) toma conhecimento da notificação dos microrganismos “problema”				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) informa o laboratório respetivo da receção da(s) notificação(ões)				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) informa a Direção-Geral da Saúde (DGS) sobre a confirmação do resultado do microrganismo “alerta” isolado e, se for caso disso, dos mecanismos de resistência envolvidos, num prazo indicativo de um mês, máximo de dois meses, após receção do isolado				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) informa o laboratório de origem sobre a confirmação do resultado do microrganismo “alerta” isolado e, se for caso disso, dos mecanismos de resistência envolvidos, num prazo indicativo de um mês, máximo de dois meses, após receção do isolado				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) envia à Direção-Geral da Saúde (DGS) os resultados acumulados sobre os microrganismos “problema” com uma periodicidade não superior a doze meses				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) realiza avaliação externa da qualidade dos procedimentos laboratoriais,				

dando relato a cada laboratório e à Direção-Geral da Saúde (DGS) de inconformidades verificadas				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) mantem lista de laboratórios inscritos na rede de vigilância e de laboratórios notificadores, enviando lista atualizada à Direção-Geral da Saúde (DGS) no início de cada ano				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) mantem lista de microrganismos alerta notificados e confirmados laboratorialmente, e do seu mecanismo de resistência, por instituição, enviando lista atualizada à Direção-Geral da Saúde (DGS) com periodicidade não superior a um mês				
Existe evidência de que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) informa o laboratório, que inicia participação no programa EARS-Net, do respetivo código				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
5: Direção-Geral da Saúde				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que a Direção-Geral da Saúde (DGS) toma conhecimento da notificação dos microrganismos “alerta”				
Existe evidência de que a Direção-Geral da Saúde (DGS) toma conhecimento da notificação dos microrganismos “problema”, em simultâneo com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)				
Existe evidência de que a Direção-Geral da Saúde (DGS) promove nos casos relevantes, o contato com o laboratório de microbiologia e com os Grupos de Coordenação Local do PPCIRA (GCL – PPCIRA) da unidade de saúde de origem para que, localmente: exista notificação interna da deteção do microrganismo para o diretor clínico e enfermeiro-diretor; sejam adotadas as medidas adequadas para o controlo e prevenção de transmissão cruzada; seja disponibilizada a colaboração técnico-científica que a unidade de saúde possa necessitar				
Existe evidência de que a Direção-Geral da Saúde (DGS) realiza relatórios anuais sobre microrganismos “problema” e microrganismos “alerta” e sobre uso de antimicrobianos em cada unidade de saúde [unidade local de saúde (ULS), centros hospitalares ou hospitais]				
Existe evidência de que a Direção-Geral da Saúde (DGS) envia a cada conselho de administração, Grupo de Coordenação Local do PPCIRA e laboratório de microbiologia o relatório sobre o seu hospital/centro hospitalar/ unidade local de saúde (ULS)				
Existe evidência de que a Direção-Geral da Saúde (DGS) envia ao conselho diretivo da administração regional de saúde (ARS) e Grupo de Coordenação Regional do PPCIRA os dados dos hospitais da respetiva Administração Regional de Saúde (ARS)				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			
6: Publicação de Resultados Por Terceiros				
Critérios	Sim	Não	N/A	EVIDÊNCIA/FONTE
Existe evidência de que a publicação de dados por terceiros obtidos no âmbito do programa de vigilância epidemiológica é autorizada obrigatoriamente por escrito, previamente, pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e Direção-Geral da Saúde (DGS)				
Sub-total	0	0	0	
ÍNDICE CONFORMIDADE	%			

Avaliação de cada padrão: $x = \frac{\text{Total de respostas SIM}}{\text{Total de respostas aplicáveis}} \times 100 = (\text{IQ}) \text{ de } \dots\%$

11.A presente Norma, atualizada com os contributos científicos recebidos durante a discussão pública, revoga a versão de 08/08/2013 e será atualizada sempre que a evolução da evidência científica assim o determine.

12.O texto de apoio seguinte orienta e fundamenta a implementação da presente Norma.



Francisco George
Diretor-Geral da Saúde

TEXTO DE APOIO

Conceito, definições e orientações

- A. Consideram-se microrganismos “alerta”, os que apresentam um padrão de resistência ou suscetibilidade intermédia aos antimicrobianos, pouco habitual ou de baixa prevalência em Portugal e que, por esta razão, o seu isolamento implique a implementação de medidas urgentes para a sua contenção. Os critérios utilizados para definir estes microrganismos estão baseados nas recomendações do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)⁽²⁾, já implementadas nos laboratórios de microbiologia do Serviço Nacional de Saúde (SNS) desde Janeiro de 2014.
- B. Consideram-se microrganismos “problema”, os microrganismos que causam frequentemente doença e com taxas de resistência epidemiologicamente significativa.
- C. Neste programa de vigilância epidemiológica, considera-se o registo do isolamento das espécies bacterianas indicadas na presente Norma: em 1 b) (ii) *a.*, com origem no sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo determinada a suscetibilidade aos antimicrobianos indicados nos quadros respetivos, registado e reportado o resultado (suscetível, intermédio, ou resistente); e em 1 b) (ii) *b.*, com outra origem. Os critérios utilizados para definir estes microrganismos estão baseados nas recomendações do EUCAST⁽²⁾, já implementadas nos laboratórios de microbiologia desde Janeiro de 2014.

Fundamentação

- A. A resistência aos antimicrobianos é um problema emergente nos cuidados de saúde, com implicações diretas na morbilidade e mortalidade. Neste contexto, prevenir a emergência e a transmissão cruzada de microrganismos com suscetibilidade intermédia ou resistência aos antimicrobianos é o objetivo desta norma.
- B. O INSA está capacitado como o único laboratório de referência nacional na área da resistência aos antimicrobianos.
- C. Pretende-se dinamizar o sistema de vigilância epidemiológica de microrganismos com resistência aos antibióticos, a partir do já proporcionado pelo programa EARS-Net, a decorrer em Portugal desde

1999, tornando mais eficaz a utilização da sua base de dados. O sistema de vigilância epidemiológica de microrganismos resistentes deverá ser baseado num processo mais participado por todos os que dele possam usufruir, de modo a permitir a construção de uma base de dados mais representativa da situação nacional. Este sistema deverá ainda permitir avaliar a evolução das taxas de resistência aos antibióticos, avaliar o impacto da introdução de medidas corretivas, detetar e dar resposta a surtos, e dar cumprimento às obrigações patentes nas recomendações da Comissão Europeia⁽³⁾.

- D. Adicionalmente, o bom fluxo de informação, em circuito, desde os laboratórios de microbiologia para o INSA e a DGS e daí de volta para os laboratórios de microbiologia e Grupos de Coordenação Local do PPCIRA permitirá fundamentar a implementação, alteração ou modulação da política de prescrição e consumo de antimicrobianos local e, sempre que se justifique, de medidas para evitar a emergência ou transmissão de microrganismos resistentes e de infeções, através das boas práticas de controlo de infeção.
- E. Com estes objetivos, é necessário agilizar o atual sistema de vigilância epidemiológica, tornando-o capaz de, não só, realizar a monitorização contínua de microrganismos com suscetibilidade intermédia ou resistência e multirresistência, mas também, detetar a emergência de surtos ou de microrganismos com resistências particulares, permitindo o planeamento e execução de respostas rápidas para o seu controlo.

Avaliação

- A. A avaliação da implementação da presente Norma é contínua, executada a nível local, regional e nacional, através de processos de auditoria interna e externa.
- B. A parametrização dos sistemas de informação para a monitorização e avaliação da implementação e impacte da presente Norma é da responsabilidade das administrações regionais de saúde e das direções dos hospitais.
- C. A efetividade da implementação da presente Norma nos cuidados hospitalares e a emissão de diretivas e instruções para o seu cumprimento é da responsabilidade dos conselhos clínicos dos agrupamentos de centros de saúde e das direções clínicas dos hospitais.
- D. A implementação da presente Norma pode ser monitorizada e avaliada através dos seguintes indicadores:



- 1) Percentagem (%) de laboratórios inscritos na rede de vigilância:
 - a) Numero de laboratórios inscritos na rede de vigilância;
 - b) Número total de laboratórios nacionais.
- 2) Percentagem (%) de laboratórios inscritos e a debitar informação para a rede de vigilância:
 - a) Numero de laboratórios inscritos e a debitar informação para a rede de vigilância;
 - b) Número total de laboratórios nacionais.
- 3) Número de relatórios mensais enviados pelo INSA à DGS com a lista de microrganismos alerta notificados e confirmados laboratorialmente, e do seu mecanismo de resistência, por instituição/unidade de saúde/12 meses.

Comité Científico

- A. A presente Norma foi elaborada no âmbito do Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde e do Conselho para Auditoria e Qualidade da Ordem dos Médicos, através dos seus colégios de especialidade, ao abrigo do protocolo existente entre a Direção-Geral da Saúde e a Ordem dos Médicos.
- B. A elaboração da proposta da presente Norma foi efetuada por José Artur Paiva (coordenação científica), Manuela Caniça (coordenação laboratorial), António Sousa Uva, Eugénia Ferreira, Jorge Machado, Margarida Pinto, Valquíria Alves e Vera Manageiro.
- C. Todos os peritos envolvidos na elaboração da presente Norma cumpriram o determinado pelo Decreto-Lei n.º 14/2014 de 22 de janeiro, no que se refere à declaração de inexistência de incompatibilidades.
- D. A avaliação científica do conteúdo final da presente Norma foi efetuada no âmbito do Departamento da Qualidade na Saúde.

Coordenação executiva

A coordenação executiva da atual versão da presente Norma foi assegurada por Cristina Martins d'Árrábida.

Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas

Pelo Despacho n.º 8468/2015, do Secretário de Estado Adjunto do Ministro da Saúde, de 23 de maio, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 149, de 3 de agosto de 2015, a Comissão Científica para as Boas Práticas Clínicas tem como missão a validação científica do conteúdo das Normas de Orientação Clínica emitidas pela Direção-Geral da Saúde. Nesta Comissão, a representação do Departamento da Qualidade na Saúde é assegurada por Carlos Santos Moreira.

Siglas/Acrónimos

Sigla/Acrónimo	Designação
ARS	Administração Regional de Saúde
DGS	Direção-Geral da Saúde
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
SNS	Serviço Nacional de Saúde
ULS	Unidade Local de Saúde

Referências Bibliográficas

1. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2011. *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Aceder em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793988>

2. EUCAST. 2015. EUCAST *Clinical Breakpoint*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

Aceder em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_reakpoint_Table.xls



DGS desde
1899
Direção-Geral da Saúde



NORMA |

da Direção-Geral da Saúde

3. EC. 2002. *Council Recommendation of 15 November 2001 "on the prudent use of antimicrobial agents in human medicine"*, (2002/77/EC), Official Journal of the European Communities, L 34/13, 5.2.2002.

Aceder em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:034:0013:0016:EN:PDF>

ANEXOS

Anexo I – Quadros

Agentes antimicrobianos que devem ser testados:

Quadro 1: *Pseudomonas aeruginosa*

Categoria do antimicrobiano	Antimicrobiano
Penicilina anti-pseudomona + inibidor das beta-lactamases	Piperacilina-tazobactame
Cefalosporinas anti-Pseudomonas	Ceftazidima Cefepima
Carbapenemes	Imipenemo Meropenemo
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Levofloxacina
Aminoglicosídeos	Gentamicina Tobramicina Amicacina Netilmicina
Polimixinas	Colistina

Quadro 2: *Acinetobacter spp.*

Categoria do antimicrobiano	Antimicrobiano
Carbapenemes	Imipenemo Meropenemo
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Levofloxacina
Aminoglicosídeos	Gentamicina Tobramicina Amicacina
Inibidores dos folatos	Co-trimoxazol
Polimixinas	Colistina

Quadro 3: *Enterobacteriaceae*

Categoria do antimicrobiano	Antimicrobiano
Penicilinas	Ampicilina ou Amoxicilina
Penicilina + Inibidor das beta-lactamases	Amoxicilina-Ácido clavulânico
Penicilina anti-pseudomonas + inibidor das beta-lactamases	Piperacilina-tazobactame
Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração	Cefuroxima
Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração	Cefotaxima ou Ceftriaxone Ceftazidima Cefepima
Cefamicinas	Cefoxitina
Carbapenemes	Ertapenemo Imipenemo Meropenemo
Monobactam	Aztreonam
Inibidores dos folatos	Co-trimoxazol
Aminoglicosídeos	Gentamicina Amicacina
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Levofloxacina Ofloxacina Moxifloxacina
Fenicol	Cloranfenicol
Gliciliclinas	Tigeciclina
Polimixinas	Colistina
Ácido fosfónico	Fosfomicina

Quadro 4: *Staphylococcus aureus*

Categoria do antimicrobiano	Antimicrobiano
Beta-lactâmico anti-estafilocócico (ou cefamicina)	Oxacilina (ou cefoxitina)
Glicopéptidos	Vancomicina Teicoplanina
Oxazolidinonas	Linezolide
Lipopeptidos	Daptomicina
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Levofloxacina Moxifloxacina
Ansamicina	Rifampicina

Quadro 5: *Enterococcus faecalis e faecium*

Categoria do antimicrobiano	Antimicrobiano
Penicilinas	Ampicilina
Glicopéptidos	Vancomicina Teicoplanina
Oxazolidinonas	Linezolide
Gliciliclinas	Tigeciclina
Aminoglicosídeos (alta concentração - HC)	Gentamicina HC (30) Estreptomina HC (300)

Quadro 6 – *Streptococcus pneumoniae*

Categoria do antimicrobiano	Antimicrobiano
Beta-lactâmicos	Penicilina
Macrólidos	Eritromicina Claritromicina Azitromicina
Cefalosporinas de 3ª geração	Cefotaxima Ceftriaxone
Fluoroquinolonas	Levofloxacina Moxifloxacina

1. Objetivo

Estabelecer os procedimentos para a manipulação e conservação de estirpes utilizadas para controlo de qualidade interno ou para outros fins.

2. Âmbito

Aplica-se ao Serviço de Patologia Clínica.

3. Definições

ATCC - "American Type Culture Collection";

CQI - Controlo de Qualidade Interno;

GS - Gelose de sangue;

Passagem - Repicagem de uma estirpe bacteriana a partir de um meio de cultura para outro fresco;

PVX - Gelose de chocolate enriquecida com PolyViteX;

TSA - Teste de suscetibilidade aos antibióticos.

4. Descrição**4.1. Princípio**

A correta manipulação das estirpes bacterianas permite preservar as suas características fenotípicas. No caso das estirpes ATCC permite garantir que os testes efetuados têm resultados fidedignos.

4.2. Material e Equipamentos

- Agulhas esterilizadas;
- Ansas esterilizadas;
- Câmara de fluxo laminar;
- Congelador (-20°C);
- Estirpes bacterianas em cultura pura em meio não seletivo, com 18 a 24 horas de incubação;
- Estirpes padrão ATCC;
- Estufa (35 ± 2°C);
- Frigorífico (2 - 8°C);
- Meio de cultura (GS ou PVX);
- Pinça esterilizada;
- Pipetas esterilizadas;
- Tubos para criopreservação de estirpes bacterianas.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.044.00				01.10.2015	1/6

4.3. Procedimento Técnico - Manipulação de Estirpes ATCC Novas

1. Selecionar o meio de cultura adequado (ver Tabela 1) e deixá-lo à temperatura ambiente;

Tabela 1: Meio de Cultura e Condições de Incubação

ESPÉCIE	ATCC	MEIO DE CULTURA	INCUBAÇÃO
<i>Escherichia coli</i>	25922	GS	35 ± 2°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	GS	35 ± 2°C
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	GS	35 ± 2°C com CO ₂
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	GS	35 ± 2°C com CO ₂
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	PVX	35 ± 2°C com CO ₂

2. Identificar a placa a semear com:

- Estirpe utilizada;
- Origem (ATCC e respetivo número, ou outra);
- Data de sementeira.

3. Seguir as instruções do fabricante para a manipulação e sementeira das estirpes ATCC (ver bula);

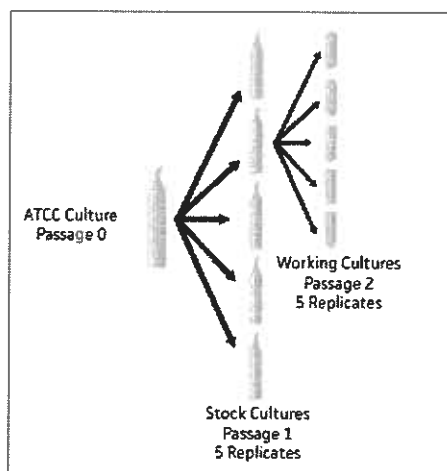
4. Incubar na estufa com a atmosfera indicada na Tabela 1, por um período aproximado de 18 a 24 horas;

5. Após a incubação verificar a qualidade da cultura (pureza e características macroscópicas):




5.1. Se a cultura estiver conforme esperado, fazer a partir desta, as culturas para armazenamento e subcultura para trabalho (ver pontos 4.4. e 4.5.);

5.2. Caso haja algum problema com a cultura, nomeadamente contaminação, tentar recuperar a estirpe original. Se tal não for possível, utilizar uma estirpe nova.

Nota: Segundo as recomendações atuais, as estirpes a utilizar para CQI não devem ser sujeitas a mais do que cinco passagens, para minimizar a possibilidade de alterações fenotípicas, genotípicas ou de contaminação.



(Imagem de "Reference Strains: how many passages are too many", ATCC Tech Bulletin no.6, 2013)

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.044.00				01.10.2015	2/6

4.4. Culturas para Armazenamento

As culturas para armazenamento servem para preservar estirpes bacterianas para fins epidemiológicos ou de CQI, por períodos prolongados. Devem ser feitas em tubos de criopreservação à temperatura de -80°C ou, por períodos de tempo mais curtos, à temperatura de -20°C (ver estabilidade previsível, no ponto 4.4.1.).

No caso específico das estirpes padrão ATCC originais, devem preparar-se tubos com culturas de armazenamento, conforme tabela do ponto 4.4.1. Ter em atenção que o número de culturas a preparar pode variar em função do prazo de validade das estirpes fornecidas ou de outros fatores a ter em conta para optimização de recursos e manutenção de qualidade.

4.4.1. Tabela 2 - Estabilidade previsível das estirpes bacterianas e número aproximado de culturas de Armazenamento.

ESPÉCIE	ATCC	ESTABILIDADE PREVISÍVEL A -20°C (meses)	Nº DE CULTURAS DE ARMAZENAMENTO
<i>Escherichia coli</i>	25922	12	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	18	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	78	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	24	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	2	3

4.4.2. Procedimento técnico

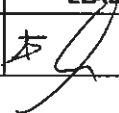

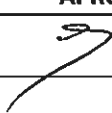
1. Identificar o tubo de criopreservação com:

- Espécie a conservar;
- Origem (ATCC e respetivo número ou outra origem);
- Data de conservação.

2. A partir da estirpe ATCC em cultura (obtida pelo procedimento descrito no ponto anterior) ou de outra estirpe a preservar (em cultura pura, com incubação entre 18 a 24 horas em meio não seletivo), retirar algumas colónias com uma ansa e colocá-las no tubo de criopreservação, suspendendo-as no meio líquido entre as contas, de forma a conseguir uma densidade aproximada de 3 a 4 MacFarland;

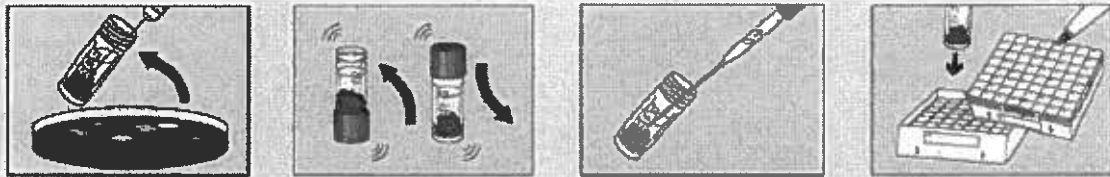
3. Fechar bem o tubo e agité-lo suavemente, por inversão, para homogeneizar;

4. Abrir novamente o tubo e com uma pipeta esterilizada remover o máximo possível de líquido;

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.044.00				01.10.2015	3/6

5. Fechar novamente o tubo, verificando que ficou bem fechado, e armazená-lo no congelador, na caixa destinada a esse efeito;
6. Registrar o armazenamento no *IMP.SPC.043 - Armazenamento de Estirpes*;
7. Criar uma folha de registo de manipulação, conforme *IMP.SPC.044 - Manipulação de Estirpes Bacterianas em Armazenamento*.

Imagem explicativa:



(imagem de MAST Cryobank™, MAST Diagnostics)

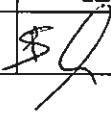


4.5. Culturas de Trabalho

As culturas de trabalho são culturas preparadas a partir de culturas de armazenamento, ou a partir da cultura original, e destinam-se à utilização posterior para fins de CQI, ou outros.

4.5.1. Procedimento Técnico

4.5.1.1. Cultura a partir de cultura original

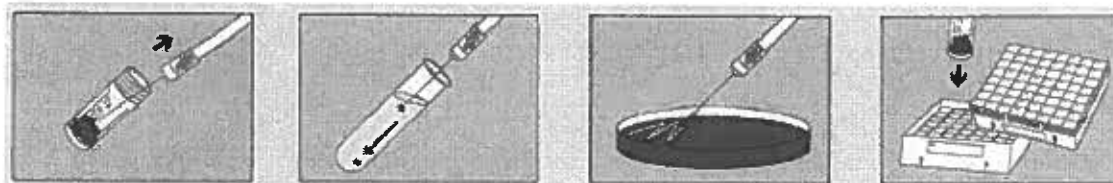
1. Fazer a subcultura de trabalho apenas depois de preparar as culturas para armazenamento;
2. Selecionar o meio de cultura adequado (para estirpes padrão ATCC ver Tabela 1) e deixá-lo à temperatura ambiente;
3. Identificar a placa a semear com:
 - Estirpe utilizada;
 - Origem (ATCC e respetivo número, ou outra);
 - Data de sementeira.
4. Fazer a sementeira como descrito na *IT.SPC.040 - Subculturas*;
5. Incubar na estufa com a atmosfera indicada na Tabela 1 por um período aproximado de 18 a 24 horas;
6. Após a incubação verificar a qualidade da cultura (pureza e características macroscópicas):
 - 6.1. Se a cultura estiver conforme esperado pode ser utilizada para fins de CQI;
 - 6.2. Caso haja algum problema com a cultura, nomeadamente contaminação, tentar recuperar a estirpe original. Se tal não for possível, utilizar uma estirpe nova.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.044.00				01.10.2015	4/6

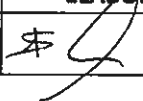

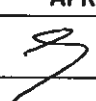
4.5.1.2. Cultura a partir de cultura de armazenamento

1. Selecionar o meio de cultura adequado (para estirpes padrão ATCC ver Tabela 1) e deixá-lo à temperatura ambiente;
2. Identificar a placa a semear com:
 - Estirpe utilizada;
 - Origem (ATCC e respetivo número ou outra);
 - Data de sementeira.
3. Verificar a localização do tubo no registo das estirpes conservadas (*IMP.SPC.043 - Armazenamento de Estirpes*);
4. Retirar o tubo do congelador e abri-lo cuidadosamente, evitando a sua contaminação ou a da tampa;
5. Introduzir uma ansa ou uma agulha (esterilizadas) no orifício de uma das contas e removê-la do tubo, depositando-a no meio a semear. Em alternativa pode utilizar-se uma pinça esterilizada;
6. Passar a conta pelo meio para que toda a sua superfície contate com o meio, garantindo um bom inóculo e um bom isolamento, e incubar na estufa com atmosfera apropriada (para estirpes padrão ATCC ver Tabela 1), durante 18-24 horas. Ter o cuidado de fechar a placa com o meio de cultura enquanto se guarda a cultura de armazenamento;
7. Fechar bem o tubo e armazená-lo no congelador, na caixa destinada a esse efeito, na devida posição;
8. Registrar a manipulação no *IMP.SPC.044 - Manipulação de Estirpes Bacterianas em Armazenamento*);
9. Após a incubação verificar a qualidade da cultura (pureza e características macroscópicas):
 - 9.1. Se a cultura estiver conforme esperado, fazer a partir desta uma subcultura nas mesmas condições (meio de cultura e incubação), para posterior utilização;
 - 9.2. Caso haja algum problema com a cultura, nomeadamente contaminação, tentar recuperar a estirpe original. Se tal não for possível, utilizar outra estirpe de armazenamento. Quando todas as estirpes de armazenamento estiverem esgotadas, utilizar uma estirpe nova.

Nota: Os tubos com as culturas de armazenamento devem estar fora do congelador o menos tempo possível, para evitar que toda a amostra descongele. Se tal acontecer fica inutilizada, não podendo ser guardada para futuras culturas de trabalho.

Imagem explicativa:


(imagem de MAST Cryobank™, MAST Diagnostics)

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.044.00				01.10.2015	5/6



4.6. Eliminação de Culturas de Armazenamento

1. A eliminação das culturas de armazenamento será feita quando:

- o armazenamento atingiu o limite previsível de estabilidade para a estirpe em causa (estirpes ATCC);
- a cultura está contaminada;
- já não há interesse em preservar a estirpe.

2. A eliminação será registada no *IMP.SPC.043 - Armazenamento de Estirpes* e no *IMP.SPC.044 - Manipulação de Estirpes Bacterianas em Armazenamento*, podendo este último ser arquivado.

5. Bibliografia

1. "Reference Strains: how many passages are too many", ATCC Tech Bulletin no.6, 2013;
2. "Cryopreservation Technical Manual Guide", Frank P. Simione, M.S. of the American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Thermo Fisher Scientific, 2009;
3. "Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos", Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde, 2006;
4. MAST Cryobank™, MAST Diagnostics: <http://www.mastgrp.com>.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.044.00				01.10.2015	6/6

1. Objetivo

Estabelecer os procedimentos para controlo de qualidade interno dos testes feitos nos equipamentos Vitek2 e MicroScan WalkAway.

2. Âmbito

Aplica-se ao Serviço de Patologia Clínica.

3. Definições

ATCC - "American Type Culture Collection"

CQI - Controlo de Qualidade Interno

GS - Gelose de sangue

MPC - Médico Patologista Clínico

PVX - Gelose de chocolate enriquecida com PolyViteX

TDT - Técnico de diagnóstico e terapêutica

TSA - Teste de suscetibilidade aos antibióticos

TSS - Técnico Superior de Saúde

4. Descrição**4.1. Princípio**

A utilização de estirpes ATCC, que têm características fenotípicas previamente conhecidas, permite avaliar os procedimentos utilizados para realização dos testes de identificação e de suscetibilidade aos antibióticos em equipamentos automáticos, e instituir medidas corretivas, caso sejam detetados erros.

4.2. Material e Equipamentos

- Ansa;
- Câmara de fluxo laminar;
- Cartas para identificação e TSA (Vitek 2):
 - GN;
 - GP;
 - AST N192;
 - AST N244;

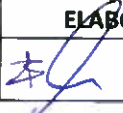


Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.045.01				16.11.2015	1/5

- AST N222;
- AST P576;
- AST P586;
- AST P619;
- AST ST01;
- Congelador (-20°C);
- Densitómetro Densichek
- Dispensador de água destilada esterilizada;
- Equipamento MicroScan Walkaway
- Equipamento Vitek 2 Compact
- Estirpes padrão ATCC
- Estufa (35 ± 2°C);
- Frigorífico (2 - 8°C);
- Meio de cultura (GS ou PVX);
- Painéis para identificação e TSA (MicroScan Walkaway):
 - Combo 69;
 - Combo 70;
 - Combo 71;
 - Combo 42;
 - MS Strept +6 (TSA *Streptococcus spp*).
- Tubos para criopreservação de estirpes bacterianas;
- Tubos para Vitek;
- Outros consumíveis necessários aos testes de identificação e TSA nos equipamentos automáticos Vitek 2 Compact e MicroScan Walkaway (descritos nas recomendações dos fabricantes).

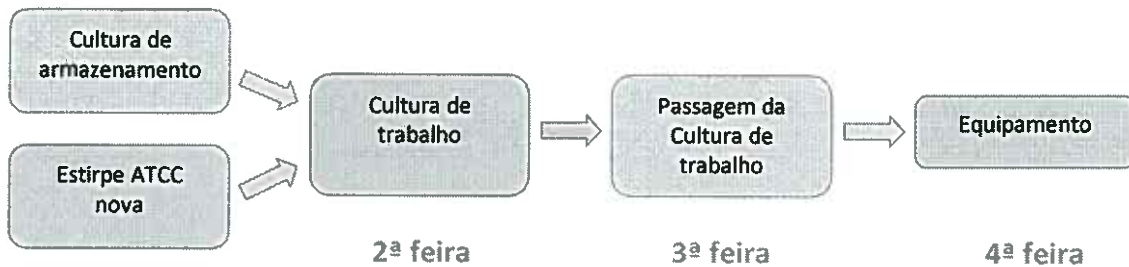
4.3. Procedimento Técnico

4.3.1. Manipulação de estirpes ATCC

1. As estirpes a utilizar serão quase sempre obtidas a partir das culturas de trabalho, seguindo o procedimento descrito na *IT.SPC.044 - Manipulação e Conservação de Estirpes Bacterianas*;
2. Quando não houver culturas de armazenamento, utiliza-se uma estirpe nova, fazendo-se uma subcultura da cultura original, conforme descrito na *IT.SPC.044 - Manipulação e Conservação de Estirpes Bacterianas*;

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.045.01				16.11.2015	2/5

3. A cultura de trabalho será preparada em cada segunda-feira e repicada na terça-feira, para poder ser utilizada na quarta-feira, segundo o esquema:



➡ 4.3.2. Calendário

O controlo de qualidade será feito mensalmente, sendo as estirpes disponíveis utilizadas semanalmente, conforme a tabela seguinte:

2ª FEIRA (CADA MÊS)	ESTIRPES	CARTAS VITEK	PAINEL WALKAWAY
Primeira	- <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	- GPI - AST P586	- Combo 42
Segunda	- <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	- GNI - AST N192 - AST N244	- Combo 69 - Combo 70
Terceira	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	- GPI - AST P576 - AST ST01	-MS Strept +6
Quarta	- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	- GPI - AST P619	- Combo 42
Quinta	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	- GNI - AST N222	- Combo 71

Nota 1: as cartas a utilizar poderão ser alteradas por indicação do fornecedor ou por alteração dos procedimentos na secção da Microbiologia.

Nota 2: nos meses em que só haja 4 segundas-feiras, fazem-se na última, duas estirpes em simultâneo (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922).

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.045.01				16.11.2015	3/5

4.3.3. Execução dos testes nos equipamentos

O TDT escalado para o setor da Microbiologia deverá utilizar as estirpes cumprindo as recomendações do fabricante de cada equipamento (ver respetivos manuais).

A - Vitek2 Compact

Seguir as recomendações do manual do equipamento, tendo em atenção o seguinte:

Mesmo quando as estirpes em uso sejam reconhecidas pelo equipamento apenas para controlo de qualidade de cartas de antibiograma, devem ser também testadas com cartas de identificação.




Nestes casos, o TSA da estirpe deve ser registado no equipamento conforme descrito no manual para as estirpes de controlo de qualidade, e a carta de identificação deve ficar registada no equipamento como se se tratasse de uma amostra de um doente, com o nome de registo ATCC seguido do número da estirpe em causa e da data de realização do teste no formato aaaammdd (a - ano; m - mês; d - dia) (exemplo: S. aureus ATCC 29213 20150505).

B - MicroScan Walkaway 96

Seguir as recomendações do manual do equipamento.

4.4. Validação e Registo de Resultados

- ➡
1. Quando os resultados estiverem disponíveis, um TDT/MPC/TSS de serviço no sector da Microbiologia deverá verificar os resultados, validando-os se estiverem de acordo com o esperado ou rejeitando-os se não estiverem;
 2. Quando os resultados não estiverem conforme o esperado, deverá procurar-se a causa do erro e corrigir-se sempre que possível. O teste deverá ser repetido na semana seguinte, juntamente com os já programados para esse dia;
 3. Os resultados e eventuais ações corretivas devem ficar registados no equipamento (nos campos disponíveis para o efeito), e no *IMP.SPC.045 - Resultados do Controlo de Qualidade Interno - Equipamentos de Microbiologia*.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.045.01				16.11.2015	4/5

5. Bibliografia

1. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia, Programa Nacional de Controlo de Infecção e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2004;
2. "Reference Strains: how many passages are too many", ATCC Tech Bulletin no.6, 2013;
3. "Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos", Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde, 2006.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.045.01				16.11.2015	5/5

ANEXO XIV – Equipamentos do setor de Imunologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respectivos valores de referência.

Equipamentos do setor de Imunologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respectivos valores de referência.

Equipamentos Imunologia	Método	Parâmetros	Valores de Referência	
Dxl Unicell	Imunoensaio Quimioluminescente	Ferritina	F 11-306.8 µg/L M 23.9-336.2 ug/L	
		Ácido Fólico	A 7-45.1nmol/L	
		Vitamina D	A 30-100 ng/mL	
		Vitamina B12	A 85-378 pmol/L	
		PTH	A 12-88 pg/mL	
		Insulina	A 6-27 um/L	
		ACTH	A 0-46 pg/mL	
		ATG	A 0-4 UI/ mL	
		ATPO	A 0-9 UI/ mL	
		Fosfatase alcalina óssea	NA	
		Hormona Tiroidea		
		T3 livre	A 2.5-3.9 pg/mL	
		T4 livre	A 0.61-1.12 ng/dL	
		T3 total	A 87-178 ng/dL	
		T4 total	A 6.1-12.2 µg/dL	
		TSH	A 0.34-5.6 µUI/mL	
		Marcadores Tumorais		
		CEA	A 0.0-3.0 ng/mL	
		CA 19 9	A 0.0-35.0 U/mL	
		CA 15.3	A 0-31.3 U/mL	
		CA 125	F 0.0-21.0 ULmL	
		PSA Total	M 0.0-4.0 ng/mL	
		PSA Livre	M 0-0.14 ng/mL	
		α fetoproteína	A 0-5.5 UI/mL	
		Hormonas Sexuais		
		Estradiol	F 55-206 pmol/L	
		Progesterona	NA	
		Testosterona	F 0-2.6 nmol/L M 6.07-27.1 nmol/L	
		LH	M 0.8-7.6 UI/L	
		FSH	M 0.7-11.1 UI/L	
Prolactina	F 1.9-25 µg/L M 2.5-17 µg/L			
ImmunoCAP™ 250	Imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)	Alergias		
		Alergênicos de Rastreio	NA	
		Epitélio de Animais		
		Ácaros		
		Ervas Infestantes		
		Gramíneas		
		Fungos		
		Ovo, Leite, Derivados		
		Peixes		
		Carnes		
		Frutos		
		Sementes e frutos secos		
		Autoimunidade		
		MPO, doseamento	NA	
		PR3, doseamento		
		CCP		
		Ac. AntiB2 Glicoproteína IgM e IgG		
Ac. Anti Cardiolipinas IgM e IgG				

Equipamentos do setor de Imunologia com especificação do método usado, os parâmetros realizados em cada equipamento e os respetivos valores de referência - Continuação

MAGO Plus	Imunofluorescência indirecta (IFI), Imunoensaio enzimático (ELISA)	ANA (IFI)	NA
		ANA (ELISA)	
		ANCA (pANCA e cANCA)	
		Ac. Anti dsDNA	
		ASMA	
		AMA	
		Ac. Anti Fosfolípidos	
		Aldosterona (Doseamento)	
		NSE (Doseamento)	
		Ac. Anti <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Ac. Anti <i>Chlamidophila pneumoniae</i>			
IMMAGE®	Nefelometria e Turbidimetria	C3	A 79-152 mg/dL
		C4	A 16-38 mg/dL
		Cadeias Leves Kappa	A 6.29-13.50 g/L (16-150 anos)
		Cadeias Leves Lamba	A 3.13-7.23 g/L (16-150 anos)
		Relação Kappa/ Lamba	1.50-2.00
		Fator reumatoide doseamento	A 0-20 UI/ml
		IgA	A 0.82-4.53 g/L
		IgE Total	A 0.0-165.0 UI/ml
		IgG	A 7.51-15.60 g/L
		IgM	A 0.46-3.04 g/L
		IgD	A 1.3-152.7 mg/L
		α I Anti-tripsina	A 88-174 mg/dL (16-150 anos)
		β2 Microglobulina	A 1.1-2.4 mg/L
		Ceruloplasmina	A 22-58 mg/dL
		Lipoproteína (a)	F 5.7-31.2 mg/dL M 5.6-33.8 mg/dL
		Microalbuminúria, U	A 0-19 mg/L
		Transferrina	A 230-430 mg/dL
Saturação da Transferrina	20-50%		
VIDAS®	Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA)	Toxoplasma IgM	NA
		Toxoplasma IgG II	
		CMV IgM	
		CMV IgG II	
		Rubéola IGM	
Rubéola IgG II			
Epstein Barr IgG			
Epstein Barr IgM			
Access®2 Immunoassay System	Imunoensaio Quimioluminescente	Cortisol	A 185-624 nmol/L
		Cortisol U24H	A 160-1112 nmol/24
		Tiroglobulina	A 1.15-130.77
		Troponina I	A 0-0,03 ng/mL
Sebia Hydrasys®	Eletroforese em gel de agarose	Eletroforese de proteínas séricas	-----

F-Feminino; M- Masculino; A- Ambos; PTH- Paratormona; ACTH- Hormona Adrenocorticotrófica; ATG- Anticorpo Anti Tiroglobulina; ATPO- Anticorpo Anti Peroxidase; NA – Não Aplicável; T3- triiodotironina; T4- tiroxina TSH- Hormona Estimuladora da Tireoide; CEA- Carcinoembryonic Antigen; CA 19.9- Carbohydrate antigen 19.9; CA 15.3- Carbohydrate antigen 15.3; CA 125- Carbohydrate antigen 125; PSA- Antígeno Específico da Próstata; LH- Hormona Luteinizante; FSH- Hormona Estimuladora do Foliculo; MPO- Mieloperoxidase; PR3- Proteinase 3; CCP- Anticorpo Anti Péptido Citrunado Cíclico; IgM- Imunoglobulina M; IgG- Imunoglobulina G; ANA- Ac. Anti Nucleares e Citoplasmáticos; ANCA- Ac. Anti Citoplasma do Neutrófilo; pANCA- ANCA perinuclear; cANCA- ANCA citoplasmático; Ac- Anticorpo; dsDNA, DNA de cadeia dupla; ASMA – Ac. Anti Músculo Liso Actina; AMA – Ac. Anti Mitocôndria; NSE- Enolase Neuro Específica; C3- Proteína complemento; C4- Proteína Complemento; IgA- Imunoglobulina A; IgE- Imunoglobulina E; IgD- Imunoglobulina D; U, Urinário; CMV, Citomegalovirus;

Fonte: SPC do CHMT

ANEXO XV – (a) IT.SPC.020.00| Orientações para o Controlo de Qualidade Interno no Setor de Hematologia; (b) IT.SPC.029.02| Orientações para o Controlo de Qualidade Interno nos Setores de Bioquímica/ Imunologia (“Imunoquímica”)

1. Objectivo

Sistematizar os procedimentos de controlo de qualidade interno no setor de Hematologia.

2. Âmbito

Aplica-se a todos os colaboradores do SPC que efetuem ou validem ensaios de controlo de qualidade interno.

3. Definições

aPTT: Tempo de Tromboplastina ativada

CQI: Controlo Interno de Qualidade

Hb A₁C: Hemoglobina Glicada A₁C

MPC: Médicos Patologistas Clínicos

PT: Tempo de Protrombina

SPC: Serviço de Patologia Clínica

TDI: Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica

TSS: Técnicos Superiores de Saúde

4. Descrição

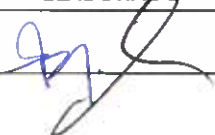

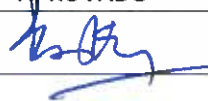
Os quadros I, II e III pretendem sistematizar a frequência e os níveis com que são processados os controlos da hematologia, bem como algumas notas adicionais.

A abertura de um novo lote de controlo deverá sempre ser comunicada a um colaborador com responsabilidades na área do CQI para que seja configurado no respetivo equipamento e nalguns casos, elaborada uma nova carta de controlo no sistema informático do SPC.

Nos contadores hematológicos automatizados são sempre processados dois níveis de controlo em modo automático (fechado). Caso o modo manual tenha de ser usado (ex: amostras pediátricas, líquidos orgânicos), deverá também ser processado um nível de controlo em modo manual.

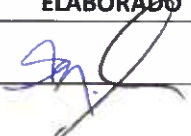


No que diz respeito à coagulação, os controlos deverão ser hidratados diariamente. Após a reconstituição, deverá ser sempre respeitado o tempo recomendado pelo fabricante até serem utilizados.

No caso de existirem dois coagulómetros, utilizar os mesmos frascos de controlo a fim de os rentabilizar.

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.020.00				03.03.2014	1/3

Quadro I
Resumo de orientações para o controlo de qualidade interno na hematologia na
Unidade de Tomar

Equipamento	ACL TOP 500/ ACL ADVANCE	Sysmex XE 2100/ Sysmex XT 1800	TEST 1	ADAMS 8160	HYDRASIS
Frequência	Diária	Diária	Semanal	Início de cada série	Em cada série
Notas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PT, aPTT – 2 níveis (normal + 1 dos 2 patológicos, em dias alternados) ▪ Fibrinogénio – 2 níveis (normal e patológico), caso existam amostras ▪ Proteína C funcional, Proteína S livre, Factor VIII, Factor de von Willebrand, Antitrombina, Anticoagulante lúpico - 2 níveis (a executar sob orientação de MPC/TSS). <p align="center">Controlos hidratados diariamente e passados em ambos os equipamentos de coagulação</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 níveis (normal + 1 dos 2 patológicos, em dias alternados) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 3 níveis (5ª feira) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hb A1C - 2 níveis ▪ Doseamento de fracções de Hb - 2 níveis (caso existam amostras) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Electroforese das hemoglobinas - 3 níveis (Hb A₂ normal, Hb A₂ patológico e de todas as fracções)
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ D-Dímeros - 2 níveis (a hidratar, caso existam amostras) 	<p>O modo manual deve ser controlado quando existam amostras manuais. Antes de processar amostras deste modo, verificar se este já foi controlado.</p>			
Armazenamento	Frigorífico urgência (FRI 9)	Frigorífico urgência (FRI 9)	Frigorífico hematologia (FRI 11)	Congelador hematologia (M22)	Congelador Nº4

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.020.00				03.03.2014	2/3

Quadro II
Resumo de orientações para o controlo de qualidade interno na hematologia na
Unidade de Abrantes

Equipamento	ACL TOP 500	Sysmex XE 2100
Frequência	Diária	Diária
Notas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PT, aPTT – 2 níveis (normal + 1 dos 2 patológicos, processados em dias alternados) ▪ Fibrinogénio – 2 níveis (normal e 1 patológico, caso existam amostras) ▪ Tempo de Trombina - 2 níveis (caso existam amostras) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 níveis (normal + 1 dos 2 patológicos, em dias alternados) <p>O modo manual deve ser controlado quando existam amostras manuais. Antes de processar amostras deste modo, verificar se este já foi controlado.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ D-Dímeros - 2 níveis (a hidratar, caso existam amostras) 	
Armazenamento	FRI B13	FRI B13

Quadro III
Resumo de orientações para o controlo de qualidade interno na hematologia na
Unidade de Torres Novas

Equipamento	ACL TOP 500	Sysmex XT 2000i
Frequência	Diária	Diária
Notas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PT, aPTT – 2 níveis (normal + 1 dos 2 patológicos), processados em dias alternados ▪ Fibrinogénio – 2 níveis (normal e 1 patológico, caso existam amostras) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 níveis (normal + 1 dos 2 patológicos, em dias alternados) <p>O modo manual deve ser controlado quando existam amostras manuais. Antes de processar amostras deste modo, verificar se este já foi controlado.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ D-Dímeros - 2 níveis (a hidratar, caso existam amostras) 	
Armazenamento	FRI 11	FRI 12

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.020.00				03.03.2014	3/3

1. Objetivo

Sistematizar os procedimentos do controlo de qualidade interno no setor de Imunoquímica.

2. Âmbito

Aplica-se a todos os colaboradores do Serviço de Patologia Clínica que efetuem ou validem ensaios de controlo de qualidade interno.

3. Definições

A1AT - Alfa 1 Antitripsina

Ac – Anticorpos

ACTH - Hormona adrenocorticotrópica

ADA - Adenosina desaminase

AFP – Alfa - fetoproteína

ALP – Fosfatase alcalina

ALT - Aminotrasferase da alanina

AMA - Ac. anti-mitocôndria (M-2)

ANA – Ac Anti-nucleares

ANCAS - Anticorpos anti-citoplasma do neutrófilo

Anti -TG – Anticorpos Anti tiroglobulina

Anti – TPO – Anticorpos Anti peroxidase

ASMA - Ac. anti-músculo liso, F-actina

AST - Aminotranferase do aspastato

BILT - Bilirubina total

Ca - Cálcio

CEA - Antígeno carcinoembrionário

CH50 - Complemento, atividade hemolítica via clássica

CK – Creatinaquinase

CKMB - Creatinina kinase isoenzima MB

Cl – Cloro

CO₂ Total - Bicarbonato

CQI - Controlo Qualidade Interno

C3 – C3 do Complemento

C4 – C4 do Complemento

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	1/9

ds-DNA - Anticorpos anti-ADN nativo

Fe – Ferro

Frig – Frigorífico

FSH – Hormona Folículo-Estimulante

GGT -Transferase da gamaglutamil

Ig – Imunoglobulina

K - Potássio

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LDH - Desidrogenase láctica

LH – Hormona Luteinizante

Lp(a) – Lipoproteína Lp(a)

Mg - Magnésio

Na – Sódio

NSE - Neuro enulase específica

PCR - Proteína C Reativa

PSA - Antigénio específico da próstata

PTH - Hormona paratiroideia

SPC - Serviço de Patologia Clínica

TASO - Título de anti-estreptolisina O

Temp. - Temperatura

➡ 4. Descrição

Os quadros apresentados, pretendem resumir os parâmetros a controlar, os níveis e o nome do controlo usado, local de armazenamento e a frequência com que são processados nos vários equipamentos dos 3 laboratórios do SPC no setor de Imunoquímica.

Quando termina um lote de controlo, devem os técnicos informar os responsáveis da secção. O novo lote de controlo deve ser analisado por estes últimos e após aprovação, deve ser dada indicação para que seja introduzido nos respetivos equipamentos, assim como, para a criação da carta de controlo no sistema informático do laboratório.


Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02	<i>[Handwritten signature]</i>	<i>[Handwritten signature]</i>	<i>[Handwritten signature]</i>	02.11.2015	2/9

Quadro I
Resumo de orientações para o controlo de qualidade interno na Imunoquímica na Unidade de Tomar

Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações
DXC800-1 e DXC800-2 (Estes equipamentos funcionam alternadamente)	Diária	Ácido úrico, Albumina, ALP, ALT, Amilase, AST, BilT, Ca, CK, Cl, Colesterol HDL, Colesterol Total, Creatinina, Fe, Fósforo, GGT, Glicose, LDH, Lipase, K, Mg, Na, Proteínas totais, Triglicéridos e Ureia	Synchron Multilevel 1, 2 e 3	Arca nº 4	Manhã: nível 1 e 2 Tarde: nível 3
		BilD	Ultimate 1 e 2		Manhã: nível 1 e 2
		PCR	Vigil Serology 1, 2 e 3	Frig nº 4	Manhã: nível 1 e 2 Tarde: nível 3
	Semanal 6ªf (ou sempre que necessário)	TASO			Semana 1: nível 1 e 2 Semana 2: nível 1 e 3 Semana 3: nível 2 e 3
		Carbamazepina ¹ , Colesterol LDL (quantitativo) ¹ , Digoxina ¹ , Fenitoína ¹ , Lítio ¹ e Teofilina ¹	Synchron Multilevel 1, 2 e 3	Arca nº 4	Processar o nível em cujo intervalo analítico se encontra o resultado da amostra e outro nível em alternância
	Sempre que haja amostras	Valproato de Sódio ¹			Processar o nível em cujo intervalo analítico se encontra o resultado da amostra e outro nível em alternância
		Acetaminofeno ¹	Vigil TDM 1, 2 e 3		Processar os 2 níveis (só são controlados os parâmetros necessários)
		Ácido Úrico, Amilase, Ca, Cl, Creatinina, Fósforo, Glicose, K, Mg, Microproteínas ¹ , Na, e Ureia (na urina)	Liquicheck Urine Chemistry 1 e 2	Frig nº 4	Processar os 2 níveis
		Cl, Glicose e Proteínas (LCR)	Liquicheck Spinal Fluid 1 e 2		Processar o nível em cujo intervalo analítico se encontra o resultado da amostra e outro nível em alternância
		Álcool etílico ¹	Synchron Alcohol 1, 2 e 3		Processar nível 1 e 2
		CKMB ¹	CKMB Serum 1 e 2	Arca nº 4	Processar o controlo
	Sempre que necessário	ADA ¹ e Colinesterase ¹	Serachem 1		
		CH50 ¹	CH50 Low e High	Arca nº 2	Processar os 2 níveis

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	3/9

Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações
ACCESS	Diária	Troponina	Liquichek Cardiac Markers Plus L, 2 e 3	Frig nº 4	Manhã: nível L e 2 Processar nível 3 sempre que necessário
	Semanal 2ªf	Cortisol sérico	Liquid Imunoassay 1		2ªf: nível 1 e 2 4ªf: nível 1 e 3 6ªf: nível 2 e 3
	Semanal 6ªf	Tiroglobulina	Liquid Imunoassay 1		Processar os 2 níveis
			Liquid Assay T-Marker 2		
Sempre que haja amostras	Cortisol livre urinário	Liquichek Urine Chemistry 1 e 2	Processar os 2 níveis		
AUTION MAX	Diária	Análise bioquímica semi-quantitativa	Kova Liqua-Trol 1 e 2	Frig nº 2	Manhã: 2 níveis
IMAGE	2ªf, 4ªf e 6ªf	Microalbuminuria	Liquichek Urine Chemistry 1 e 2	Frig nº 4	Manhã: 2 níveis
		Factor reumatóide	Vigil Serology 2 e 3		
		Cadeias leves Kappa, Cadeias leves Lambda, IgA, IgG, IgM e Transferrina	Vigil Protein 1 e 2	Arca nº 4	
	4ªf e 6ªf	C3 e C4			
	Semanal 6ªf	A1AT, Ceruloplasmina, IgE total e Lp(a)	BET2 Low e High	Frig nº 4	
Beta 2 Microglobulina					
GEM PREMIER 3000	Sempre que se introduz um PAK novo	Gasimetria	CVP 1, 2, 3 e 4	Temp ambiente Sala Imunoquímica Bloco Gem premier gaveta 1	Processar os 4 níveis
GEM PREMIER 3000 – UCPC	Semanal 2ªf (exceto se não for oportuno para a UCPC)	Gasimetria	ContrIL 9 1, 2 e 3		Tarde: 3 níveis
VIDAS	Sempre que haja amostras	Ac Anti-EBV IgG/IgM e EBNA, Ac Anti-Citomegalovírus IgG/IgM, Ac Anti-Rubéola IgG/IgM e Ac Anti-Toxoplasma IgG/IgM	C1 e C2	Dentro de cada kit no frig. nº1	CQI do próprio kit, efetuado sempre que se abre um novo lote ou expira a calibração (+/- 14 dias ou 28 dias)

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	4/9

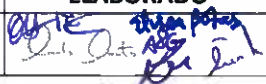




Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações
MAGO PLUS	4xsemana	Elisa: Ac. Anti fosfolípidos IgG/IgM, Ac. para <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> IgG/IgM, Ac. para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG/IgM, Aldosterona, AMA, ASMA, ANA, ds-DNA e NSE IFI: ANA, ANCAS e Triplo Tecido	Controlo Negativo e Positivo	Dentro de cada kit no frig. nº 3	CQI do próprio kit, efetuado em simultâneo com a série de amostras, seguindo instruções de programação
UNICAP 250	3ºf e 5ºf	Alergias e Autoimunidade (exceto ANA e ds-DNA)	Controlo de Curva IgA, IgE, IgG, IgM e Controlo específico	Frig nº 1	No início de cada ensaio são sempre incluídos os Controlos de cada curva; os controlos específicos são processados sempre que haja necessidade
HYDRASIS	Sempre que haja amostras suficientes	Proteinograma	Controlo Serum Normal	Arca nº4	Sempre que haja 53 amostras
		Imunofixações	Controlo IT/IF		Trimestral
DXI	2ºf, 4ºf e 6ºf	AFP, CA15.3, CA19.9, CA125, CEA e PSA total	Liquicheck Tumor Marker 1, 2 e 3	Frig nº 4	2ºf: nível 1 e 2 4ºf: nível 1 e 3 6ºf: nível 2 e 1
		Ferritina e Hormonas Tiroideas	Liquicheck Imunoassay Plus 1, 2 e 3		
	Semanal 2ºf	Anti -TG e Anti - TPO	Liquicheck Specialty Imunoassay 1, 2 e 3	Arca nº2	Semana 1: nível 1 e 2 Semana 2: nível 1 e 3 Semana 3: nível 2 e 3
		Insulina		Frig. nº 4	
	Semanal 4ºf	Ácido Fólico e Vitamina B12	Liquicheck Imunoassay Plus 1, 2 e 3	Arca nº2	
		Estradiol, LH, Prolactina, Progesterona, Testosterona		Frig. nº 4	
	Semanal 6ºf	PTH	Liquicheck Specialty Imunoassay 1, 2 e 3	Arca nº 2	
		PSA livre	Liquicheck Tumor Marker 1, 2 e 3	Frig. nº 4	
		Vitamina D	Liquicheck Imunoassay Plus 1, 2 e 3		
		Fosfatase alcalina ossea	Ostase 1 e 2		
				Processar os 2 níveis	

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	5/9




Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações
IMMULITE 2000	Semanal 6ªf	ACTH	ACT Control 1 e 2	Arca nº 2	Processar os 2 níveis
		FSH	Liquichek Imunoassay Plus 1, 2 e 3		Semana 1: nível 1 e 2 Semana 2: nível 1 e 3 Semana 3: nível 2 e 3
Micro Osmometro	Sempre que haja amostras	Osmolalidade urinária	Clinitrol 290	Temp. ambiente Sala Imunologia 1 Gaveta 1	Processar o controlo e introduzir valores no Modulab

¹ – Parâmetros efetuados preferencialmente no DXC800-1. Só se faz no DXC800-2 por inoperacionalidade do DXC800-1

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	6/9

Quadro II
**Resumo de orientações para o controlo de qualidade interno na Imunoquímica na
Unidade de Abrantes**

Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações
DXC800-1	Diária	Ácido úrico, Albumina, ALP, ALT, Amilase, AST, Ca, CK, Cl, Colesterol HDL, Colesterol Total, Creatinina, Fósforo, GGT, Glicose, LDH, Lipase, K, Mg, Na, Proteínas totais, Triglicéridos e Ureia	Synchron Multilevel 1, 2 e 3	Frig nº 1	Manhã: 2 níveis (processar sempre o nível 2, alternar entre o 1 e o 3) Tarde: Processar o nível que não tiver sido feito de manhã e o nível 2 nos parâmetros calibrados
		BILD e BILT	Ultimate 1, 2 e 4		Manhã: nível 1 e 2 Processar nível 4 sempre que necessário
		CKMB	CKMB Serum 1 e 2		Manhã: Processar os 2 níveis
		PCR	Vigil Serology 1, 2 e 3		Manhã: Processar 2 níveis alternados
	Sempre que haja amostras	Vancomicina	Synchron Multilevel 1, 2 e 3		Processar 2 níveis alternados
		Digoxina, Gentamicina, Teofilina e Valproato de Sódio	Vigil TDM 1, 2 e 3		
		Álcool etílico e Amónia	Amónia/Alcool 1, 2 e 3		
		Colinesterase	Multiquel 1, 2 e 3		Processar os 3 níveis
		Cl, Glicose e Proteínas (LCR)	Liquicheck 1 e 2		Processar os 2 níveis
DXC800-2	Diária	ALT, AST, Ca, Cl, Creatinina, GGT, Glicose, LDH, K, Na e Ureia	Synchron Multilevel 1, 2 e 3		Manhã: 2 níveis (processar sempre o nível 2, alternar entre o 1 e o 3) Tarde: Processar o nível que não tiver sido feito de manhã e o nível 2 nos parâmetros calibrados
		BILD e BILT	Ultimate 1, 2 e 4		Manhã: nível 1 e 2 Processar nível 4 sempre que necessário
		PCR	Vigil Serology 1, 2 e 3		Manhã: Processar 2 níveis alternados

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	7/9

**CHMT**

CENTRO HOSPITALAR MÉDIO TEJO, E.P.E.




INSTRUÇÃO DE TRABALHO**ORIENTAÇÕES PARA O CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO NO SETOR DE IMUNOQUÍMICA**

Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações
ACCESS	Diária	Troponina	Liquichek Cardiac Markers Plus L e 2	Frig nº 1	Manhã: Processar os 2 níveis
		Mioglobina			
	Sempre que haja amostras	Beta HCG	Imunoassay Plus 1, 2 e 3		Processar 2 níveis alternados
IMAGE	Diária (Sáb e Dom só se houver amostras que justifique)	PCR	Vigil Serology 1 e 2	Frig nº 1	Manhã: 2 níveis
AUTION MAX	Diária	Análise bioquímica semi-quantitativa	Kova Liqua-trol 1 e 2		Manhã: 2 níveis
GEM PREMIER 3000	Sempre que se introduz um PAK novo	Gasimetria	CVP 1, 2, 3 e 4	Frig. nº 5	Processar os 4 níveis
GEM PREMIER 3000 - UCIP	Semanal 3ªf (exceto se não for oportuno para a UCIP)	Gasimetria	ContrIL 9 1, 2 e 3		Processar os 3 níveis

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	8/9

Quadro III
Resumo de orientações para o controlo de qualidade interno na Imunoquímica na
Unidade de Torres Novas

Equipamento	Frequência	Parâmetros	Nome do Controlo	Armazenamento	Observações	
LX20	Diária	Ácido úrico, Albumina, ALP, ALT, Amilase, AST, BILT, Ca, CK, Cl, CO ₂ Total, Creatinina, Fósforo, GGT, Glicose, K, LDH, Mg, Na, Proteínas totais, e Ureia	Synchron Multilevel 1, 2 e 3	Frig nº 11/12	Manhã: nível 1 e 2 Tarde: nível 3	
		BILD	Ultimate 1 e 2	Arca nº 5	Manhã: nível 1 e 2	
		PCR	Vigil Serology 1, 2 e 3		Manhã: nível 1 e 2 Tarde: nível 3	
	Sempre que haja amostras	Digoxina	Synchron Multilevel 1, 2 e 3	Frig nº 11/12	Processar o nível em cujo intervalo analítico se encontra o resultado da amostra e outro nível em alternância	
		Álcool etílico	Synchron Alcohol 1, 2 e 3			
		CKMB	CKMB Serum 1 e 2			Processar nível 1 e 2
		Cl, Glicose e Proteínas (LCR)	Liquichek Spinal Fluid 1 e 2			Processar os 2 níveis
Acess	Diária	Troponina	Liquichek Cardiac Markers Plus L, 2 e 3		Manhã: Processar os 3 níveis	
AUTION MAX	Diária	Análise bioquímica semi-quantitativa	Kova Liqua-Trol 1 e 2		Manhã: 2 níveis	
GEM PREMIER 3000 (2 equipamentos)	Sempre que se introduz um PAK novo	Gasimetria	CVP 1, 2, 3 e 4	Temp. ambiente Armário nº15	Processar os 4 níveis	

Nº DOC	ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁG. Nº.
IT.SPC.029.02				02.11.2015	9/9