



# Manual de Procedimentos Para Testes Laboratoriais

**Ministério da Saúde**

PROGRAMA NACIONAL DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS / AIDS

# Manual de Procedimentos Para Testes Laboratoriais

**Ministério da Saúde**

PROGRAMA NACIONAL DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS/AIDS

©1992 - Ministério da Saúde  
Secretaria Nacional de Assistência à Saúde  
Departamento de Programas de Saúde  
Programa Nacional de Controle de DST/AIDS  
Esplanada dos Ministérios - Bloco G - Sobreloja  
CEP: 70.058-900  
Tel.: (061) 315-2520  
Fax.: (061) 315-2519

Impresso no Brasil/Printed in Brazil

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Ministério da Saúde: Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Departamento de Programas de Saúde. Coordenação Geral de Programas Clínico-Sanitários. Coordenação do Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS.

Diagnóstico laboratorial das doenças sexualmente transmissíveis/Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, Departamento de Programas de Saúde, Coordenação Geral de Programas Clínico-Sanitários, Coordenação do Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS - Brasília: Coordenação do Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS, 1992.

44 p.: il.

## SUMÁRIO

	pág.
APRESENTAÇÃO .....	5
OBJETIVOS .....	7
MÓDULO I – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SÍFILIS .....	9
1. PESQUISA DO <i>Treponema pallidum</i> EM MATERIAL DO PACIENTE .....	13
1.1. Exame microscópico de campo escuro .....	13
1.2. Exame por imunofluorescência direta .....	13
2. TESTES SOROLÓGICOS .....	14
2.1. Testes preliminares, não treponêmicos .....	14
2.2. Testes confirmatórios treponêmicos .....	16
2.3. Interpretação dos testes sorológicos .....	19
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
MÓDULO II – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA GONORRÉIA .....	21
1. COLHEITA DA AMOSTRA CLÍNICA .....	25
1.1. Colheita da amostra na mulher .....	25
1.2. Colheita da amostra no homem .....	26
2. EXAME BACTERIOSCÓPICO DIRETO .....	26
2.1. Preparo do esfregaço .....	26
2.2. Coloração pelo Método de Gram .....	27
2.3. Leitura das lâminas .....	27
3. SEMEADURA DA AMOSTRA CLÍNICA .....	27
3.1. Meios de cultura comumente usados .....	27
3.2. Técnica de semeadura .....	27
3.3. Incubação das placas .....	27
4. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA .....	28
5. IDENTIFICAÇÃO DEFINITIVA .....	28
6. LIBERAÇÃO DOS LAUDOS .....	29
6.1. Bacterioscopia .....	29
6.2. Cultura .....	29

7. PESQUISA DE <i>N. gonorrhoeae</i> RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS .....	29
7.1. Teste iodométrico rápido .....	30
7.2. Teste acidométrico rápido .....	31
7.3. Teste da Cefalosporina cromogênica .....	32
8. ESTOCAGEM DE <i>N. gonorrhoeae</i> .....	32
9. CONTROLE DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE DST .....	33
9.1. Controle de qualidade do Gram .....	33
9.2. Controle de qualidade do meio de Thayer Martin modificado (TMM) .....	33
9.3. Controle de qualidade dos carboidratos .....	36
9.4. Controle de qualidade da prova de oxidase .....	36
ANEXO I – Reagentes para Coloração de Gram .....	36
ANEXO II – Meio de Cultura de Thayer Martin Modificado .....	37
ANEXO III – Teste de Citocromo-Oxidase .....	38
ANEXO IV – Metabolização de Carboidratos .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
MÓDULO III – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO SEXUAL NÃO-GONOCÓCICA .....	
1. CANCRO MOLE .....	45
1.1. Coleta da amostra clínica para bacterioscopia .....	45
1.2. Coleta da amostra clínica para cultura .....	45
1.3. Liberação dos laudos .....	45
2. DONOVANOSE .....	45
2.1. Diagnóstico laboratorial .....	46
2.2. Liberação dos laudos .....	46
3. VAGINITE POR <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	46
3.1. Diagnóstico laboratorial .....	46
3.2. Liberação dos laudos .....	47
4. TRICOMONÍASE .....	47
4.1. Diagnóstico laboratorial .....	47
4.2. Liberação de laudos .....	47
5. CANDIDIÁSE .....	47
5.1. Diagnóstico laboratorial .....	48
5.2. Liberação de laudos .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS DST CAUSADAS POR <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## APRESENTAÇÃO

A incidência das doenças sexualmente transmissíveis (DST) tem aumentado em proporção verdadeiramente alarmante e se tornou um grave problema de saúde pública em todo o mundo. É necessário, portanto, controlá-las, já que as DST não apenas atacam a população adulta mas afetam, também, o adolescente, o feto e o recém-nascido.

O controle dessas doenças é bastante difícil em vista de diversos fatores, dentre os quais destacamos os de ordem social e médica.

Ao examinar estes fatores, conclui-se que as mudanças nos padrões de comportamento sexual e o uso de métodos contraceptivos têm contribuído para o aumento generalizado das DST. Em adição ao grande número de casos assintomáticos ou não diagnosticados que persistem como reservatórios, perpetuando as infecções. Além do gonococo e do **Treponema pallidum**, existem muitos outros microorganismos que são transmitidos pelo ato sexual. Várias combinações destes microorganismos coexistem e são transmitidas simultaneamente. Portanto, infecções múltiplas existem e devem ser tratadas adequadamente. Muitos dos microorganismos respondem bem à terapia antibiótica, embora recidivas ocorram. Tendo em vista a ocorrência de resistência aos antibióticos, a rotina terapêutica deve ser cuidadosa.

Algumas dessas infecções podem persistir no estado de latência, tornando-se ativas meses ou mesmo anos após a infecção inicial a reinfecção é comum, particularmente entre certos grupos populacionais.

O controle das doenças sexualmente transmissíveis deve envolver uma equipe multidisciplinar, na qual o especialista em laboratório é responsável pelos exames laboratoriais necessários para a confirmação e/ou diferenciação do diagnóstico.

Este fascículo, que contou, em sua elaboração, com o apoio técnico dos doutores Mário E. Camargo, Dalair Antônia Neto de Souza, Déborah Mongagnini, Geni Noceti de Lima Câmara e Marta Antunes de Oliveira, contém técnicas e procedimentos para o diagnóstico dos microorganismos envolvidos com as doenças sexualmente transmissíveis e é dirigido especificamente para o pessoal que trabalha na área de laboratório.

**Lair Guerra de Macedo Rodrigues**  
Coordenadora  
Programa Nacional de Controle de DST/AIDS

## **OBJETIVOS**

### **Gerais:**

- Padronizar os reagentes e técnicas usadas no diagnóstico das doenças sexualmente transmissíveis;
- Criar um sistema único de dados laboratoriais que permita determinar a prevalência de algumas DST;
- Enfatizar a importância do laboratório no controle das DST.

### **Específicos:**

- Executar os testes laboratoriais recomendados para apoio diagnóstico das DST;
- Explicar os princípios dos testes utilizados para apoio diagnóstico das DST;
- Interpretar os resultados dos testes laboratoriais;
- Registrar e analisar os dados obtidos;
- Liberar adequadamente os resultados laboratoriais;
- Implantar controle de qualidade no laboratório de DST.

**MÓDULO I**  
**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SÍFILIS**



## SÍFILIS

Doença causada pelo **Treponema pallidum**, é transmitida sexualmente, por via placentária e, eventualmente, por transfusão de sangue. A lesão inicial, protosifiloma ou cancro duro, é uma ulceração indolor de bordas endurecidas, que aparece de 2 a 6 semanas após o contágio e desaparece após cerca de 2 meses. Esquemáticamente, a essa fase de **sífilis primária** segue-se a de **sífilis secundária**, com erupção cutânea papular, lesões mucosas e reação ganglionar. Em seguida a infecção entra em **fase de latência**, chamada **precoce** no primeiro ano de doença e **tardia** depois desse período. Anos depois pode se manifestar a **sífilis terciária**, com lesões principalmente cardiovasculares ou de sistema nervoso central.

## 1. PESQUISA DO *Treponema pallidum* EM MATERIAL DO PACIENTE

Na sífilis recente o *T. pallidum* pode ser detectado por exame microscópico, de campo escuro ou de imunofluorescência, no exsudato da lesão primária, em material de lesões secundárias, principalmente de mucosas, e em material de punção ganglionar. Em recém-nascidos com sífilis congênita, pode ser encontrado em exsudato nasal e de nasofaringe.

### 1.1. Exame microscópico de campo escuro

#### 1.1.1. Coleta do material

De uma coleta adequada depende o bom êxito da pesquisa. Limpar cuidadosamente a superfície da lesão com gaze umedecida em solução fisiológica, evitando sangramento. Coletar o exsudato límpido que se forma na lesão, tocando-o diretamente com uma lâmina de microscopia ou transferindo-o para esta alça bacteriológica ou com capilar.

#### 1.1.2. Observação microscópica:

O material, entre-lâmina e lamínula, é examinado imediatamente por microscopia de campo escuro. No caso de alguma demora para o exame, a lamínula pode ser grudada sobre a lâmina, com parafina. A lâmina pode ser conservada à temperatura ambiente e o exame realizado até 1 ou 2 horas depois. Verificar a exata centralização do condensador de campo escuro e as condições de iluminação, o que poderá ser feito previamente com um preparado contendo um raspado de gengivas em uma gota de solução salina. Este material habitualmente contém espiroquetas de *Treponema denticola*, biotipo *microdentium*.

Observar os preparados com objetiva seca (40x a 60x) e os organismos suspeitos com objetiva de imersão. O *T. pallidum* é um espiroqueta delicado, com 6  $\mu$ m a 10  $\mu$ m de comprimento e forma de saca-ro-lhas com espirais apertadas, intensamente móvel. Apresenta movimentos de translação para frente e para trás e movimentos de rotação sobre o eixo longitudinal.

#### 1.1.3. Interpretação:

Sendo adequada a coleta, o exame microscópico de campo escuro, de material de protosifiloma, é de grande sensibilidade, com positividade maior do que 95%. Resultados negativos não excluem sífilis e devem ser repetidos diante de uma suspeita clínica da doença. Exames negativos podem ser causados por limpeza da lesão com água e sabão, pela ação local ou sistêmica de drogas treponemicidas, ou verificados em lesões de mais longa duração. Em lesões bucais há risco de resultados positivos falsos pela presença de espiroquetas não patogênicos, de morfologia semelhante.

### 1.2. Exame por imunofluorescência direta

O material a examinar pode ser delicadamente distendido sobre lâminas de microscopia, cerca de 10  $\mu$ l para uma área de 1 cm<sup>2</sup>, e seco ao ar. As lâminas devem ser processadas no mesmo dia ou fixadas em acetona por 10 minutos e conservadas em congelador até a realização do exame, podendo ser enviadas, em gelo, a laboratórios adequadamente equipados para o teste.

Para o exame, os preparados são incubados por 30 minutos com conjugado fluorescente específico para o *T. pallidum*, em geral um anticorpo monoclonal marcado. Mais simplesmente, pode-se incubar sobre os

preparados um soro sífilítico de alto título, adequadamente diluído e previamente absorvido com "Absorvente para FTA-ABS". Depois de lavadas, as lâminas são incubadas com conjugado anti IgG humana, como para o teste FTA-ABS. Depois de montados com glicerina-alcálica e laminula, os preparados são examinados em microscopia de fluorescência, como para o teste FTA-ABS. Nos testes positivos são observados treponemas intensamente fluorescentes.

A técnica de imunofluorescência permite o exame do material mesmo depois de alguns dias de colhido. Além disso, fornece resultados específicos que possibilitam a diferenciação entre o *T. pallidum* e treponemas não patogênicos eventualmente presentes, que não são corados.

## 2. TESTES SOROLÓGICOS

### 2.1. Testes preliminares não treponêmicos:

Estes testes detectam anticorpos anti-lipídicos que se formam no paciente infectado em resposta a material lipídico, libertado tanto de suas próprias células lesadas como dos treponemas.

Os testes anti-lipídicos utilizam um antígeno biologicamente inespecífico, a cardiolipina (difosfatidilglicerol), fosfolípide presente em tecidos animais e extraído do coração de boi, à qual se associam a lecitina e o colesterol. Representados pelo teste do VDRL e suas variantes, são reações de floculação, mas há também o teste de fixação do complemento, hoje de utilização muito limitada.

A sensibilidade e a especificidade destes testes são ajustadas segundo as proporções dos componentes do antígeno e as características da suspensão antigênica utilizada, bem como da técnica de execução do teste, que deve ser rigorosamente seguida. Variações tanto do antígeno como da técnica, por pequenas que pareçam, podem aumentar significativamente as porcentagens de resultados falso-positivos e falso-negativos, que freqüentemente passam despercebidos ao laboratorista.

#### 2.1.1. Teste do VDRL em lâminas

##### 2.1.1.1. Equipamento e material necessários:

- centrífuga, para separação dos soros;
- banho-maria, ajustado a  $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;
- agitador tipo Kline, com  $180 \pm 2$  rotações por minuto, com amplitude de 2 cm;
- microscópio com objetiva de 10 aumentos;
- lâminas ou placas de vidro transparente, com áreas circulares demarcadas com anéis de 14mm de diâmetro interno, ou placas com escavações circulares, tipo Kline;
- tubos de ensaio;
- pipetas de 1ml em centésimos e de 5ml em décimos;
- seringa tipo Luer, de 1ml ou 2ml;
- agulhas calibre 18, sem bisel, fornecendo  $60 \pm 2$  gotas por mililitro. (Adapte a agulha a uma pipeta ou seringa de 2ml, graduadas, e conte o número de gotas correspondentes a 1ml de água ou de solução salina).

##### 2.1.1.2. Reagentes:

- Antígeno VDRL de boa procedência;
- Solução salina tamponada (SST), com  $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$

##### Composição:

- |   |        |
|---|--------|
| ● Cloreto de sódio .....                                  | 10,0ml |
| ● Fosfato dissódico anidro .....                          | 0,37g  |
| ● Fosfato monopotássico anidro .....                      | 0,17g  |
| ● Formaldeído .....                                       | 0,5ml  |
| ● Água destilada para .....                               | 1000ml |
| ● Conferir o pH. Conservar em frascos com tampa de rosca. |        |

– Solução salina a 0,9% – Dissolver 9g de NaCl em água destilada para 1000ml.

#### 2.1.1.3. Soros controle

Soro reagente, soro fracamente reagente e soro não reagente, testados contra padrões respectivos de um laboratório de referência.

#### 2.1.1.4. Procedimento

##### Soros:

Aquecer em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Se utilizados depois de 4 horas desta inativação, aquecer novamente a  $56^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

##### Suspensão antigênica:

Pipetar 0,4ml de SST em frasco de 30ml, com rolha de vidro, redondo, de fundo plano. Gota a gota, adicionar por 6 segundos, 0,5ml de antígeno, contido na metade inferior de uma pipeta de 1ml, graduada, enquanto se imprime ao frasco, delicado movimento de rotação sobre uma superfície plana. Na última, gota, esvaziar a pipeta. Continuar a rotação por mais 10 segundos. Adicionar ao frasco 4,1ml de SST, arrolhar e agitar, por movimentos verticais, cerca de 30 vezes em 10 segundos. Não devem ser preparados volumes menores de suspensão antigênica. No caso de maior número de testes, podem ser preparados volumes dobrados, mas não maiores. A suspensão antigênica deve ser utilizada no mesmo dia. Entretanto, há referência de boa preservação distribuindo-a em alíquotas, que podem ser conservadas em congelador por até 30 dias e utilizadas totalmente quando degeladas.

##### Teste qualitativo:

Os soros e os reagentes devem estar à temperatura ambiente, que para a realização do teste deverá ficar entre  $23^{\circ}\text{C}$  e  $29^{\circ}\text{C}$ . Colocar  $50\mu\text{l}$  de soro inativado na área circular da lâmina (este volume deve ser rigoroso, a partir de pipeta automática de  $50\mu\text{l}$  ou de pipeta de vidro de 0,1ml, graduada). Adicionar 1 gota (1/60ml) da suspensão antigênica. Imprimir rotação à lâmina por 4 minutos (180 r.p.m., amplitude 2cm). Ler imediatamente em microscópio com objetiva 10x e ocular 10x. Flocculações com partículas grandes ou médias correspondem a **soros reagentes**, pequenas a soros **fracamente reagentes** e partículas antigênicas bem dispersas ou apenas levemente grosseiras, a **soros não reagentes**. Ocasionalmente, soros fortemente reagentes apresentam resultado negativo, em consequência a uma reação de prozona. Por este motivo, sempre deve se incluir nos testes diluições de soro a 1:10 em solução salina, que resultarão reagentes nos casos de reação de prozona.

##### Testes quantitativos:

Preparar diluições dobradas do soro diretamente na lâmina, por adição e transferência a volumes sucessivos de  $50\mu\text{l}$  de solução salina, desprezando-se  $50\mu\text{l}$  da última diluição. Toma-se como título a última diluição nitidamente reagente (não fracamente reagente).

#### Teste do VDRL em líquido cefalorraqueano (LCR)

As amostras de LCR a testar são previamente centrifugadas mas não inativadas.

Diluir a suspensão antigênica a 1:2 com solução salina a 10% (dissolver 10g de NaCl em água destilada, completar para 100ml). Misturar delicadamente, aguardar 5 minutos. Não utilizar depois de 2 horas. O teste é feito em lâminas escavadas, com cavidade de 16mm de diâmetro e 1,75mm de profundidade, estando as amostras e a suspensão antigênica com temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}$  a  $29^{\circ}\text{C}$ ). A  $50\mu\text{l}$  de LCR, adicio-

nar 1 gota de 10 $\mu$ l (0,01ml) da suspensão antigênica. Esta deve ser gotejada com agulha de calibre 22 fornecendo 100  $\pm$  2 gotas por mililitro. Agitar as lâminas por 8 minutos de rotação (180  $\pm$  2 r.p.m.) e ler ao microscópio. As amostras reagentes podem ser tituladas em teste quantitativo realizado com diluições dobradas do LCR em solução salina a 0,9%.

## 2.2. Testes confirmatórios treponêmicos

Estes testes detectam anticorpos suscitados por determinantes antigênicos do **T. pallidum**. Inicialmente foi desenvolvido o teste de Imobilização do Treponema (TPI), considerado como padrão, mas que não é utilizado para fins de rotina. Para exames de rotina, utiliza-se o teste de imunofluorescência (FTA-ABS), com formas de **T. pallidum** fixadas em lâminas de microscopia, e o teste de microemaglutinação (MHATP), com hemácias recobertas com componentes antigênicos do **T. pallidum**.

### 2.2.1. Teste FTA-ABS

Sobre as lâminas com treponemas, incubam-se os soros, previamente absorvidos. Para revelar os anticorpos eventualmente fixados sobre os treponemas, as lâminas, depois de lavadas, são incubadas com um conjugado de anticorpos anti-globulinas humanas com fluoresceína. Para os soros reagentes, os treponemas se mostram fluorescentes ao exame por microscopia de fluorescência. Para que o teste seja específico, é necessário afastar as reações de anticorpos, presentes no soro, contra antígenos "de grupo", comuns a treponemas não patogênicos que ocorrem no organismo humano. Para esse fim, estes anticorpos são bloqueados pela adição prévia, ao soro, de um "Absorvente" que contém os antígenos de grupo.

A sensibilidade do teste depende de numerosos fatores, relacionados com o equipamento de microscopia fluorescente, a reatividade do antígeno, as características e diluição do conjugado fluorescente, a execução e leitura corretas do teste, bem como de um reagente "absorvente" satisfatório. Desse modo, o teste FTA-ABS deve ser rigorosamente padronizado em cada laboratório com o auxílio de soros controle.

#### 2.2.1.1. Equipamento e material necessários:

- microscópio de fluorescência, de transiluminação ou de epiiluminação, com filtros para fluoresceína e com campo escuro;
- estufa bacteriológica a 37 $^{\circ}$ ;
- caixa plástica com tampa, para incubação das lâminas em ambiente úmido;
- lâminas de microscopia de 1mm de espessura, com áreas circulares de 5mm de diâmetro;
- lamínulas 24 x 60;
- cubas de Coplin para lavagem de lâminas.

#### 2.2.1.2. Reagentes:

- suspensão antigênica de **T. pallidum** cepa Nichols, liofilizada;
- acetona, p.a.;
- conjugado fluorescente anti IgG humana;
- reagente absorvente;
- solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS);
- solução estoque de azul de Evans a 0,01g%;
- PBS com Tween 80 a 1%;
- glicerina alcalina (9 partes de glicerina, uma parte de tampão carbonato-bicarbonato de sódio, 0,5M, pH 8,5).

#### 2.2.1.3. Soros controle

- a) soro reagente;
- b) soro não reagente;

- c) soro de reatividade mínima (1+);
- d) soro positivo falso, testados contra soros de um laboratório de referência.

#### 2.2.1.4. Procedimento:

##### Preparo das lâminas:

Reconstituir a suspensão liofilizada de treponemas segundo as instruções do fabricante. Homogeneizar delicadamente, com pequena seringa e agulha fina, para dispersão completa dos treponemas, que deve ser controlada por microscopia de campo escuro. Colocar uma gota da suspensão em cada área circular da lâmina, aspirando todo o excesso, ficando uma película de líquido sobre toda a área (lâminas bem limpas e desengorduradas). Acertar a diluição final da suspensão para se obter de 30 a 40 treponemas por campo microscópico (45x).

Secar as lâminas ao ar por 15 minutos, imergi-las em acetona por 10 minutos (esta fixação é opcional), secar, embrulhar em papel e conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. A reatividade de cada lote de lâminas deve ser verificada através de testes com os soros controle.

##### Teste:

Retirar as lâminas do congelador e aquecê-las ligeiramente com jato de ar quente, para impedir condensação de água do ar ambiente.

Diluir os soros, inativados, a 1:5 com o reagente absorvente (0,05ml de soro + 0,2ml de absorvente). Misturar bem, transferir uma gota (30 $\mu\text{l}$ ) de cada soro diluído para uma área correspondente da lâmina. Incluir os soros controle reagente, de reação mínima, e não reagente, diluídos segundo as instruções que os acompanham, bem como uma área apenas com solução salina, para controle do conjugado. Incluir também o soro controle falso-positivo, contendo apenas anticorpos de grupo, não específicos. Este soro deve ser incluído diluído a 1/5 em solução salina, que deve resultar positivo, e diluído a 1/5 em "absorvente", que deve resultar negativo. Incubar as lâminas em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Lavar em PBS corrente por 5 segundos, imergir em cubas com PBS por 5 minutos, duas vezes, escorrer e secar com jato de ar quente ou entre folhas de papel de filtro, delicadamente, sem atrito.

Adicionar a cada área, uma gota de conjugado diluído, segundo o título, em PBS-Tween 80 com azul de Evans a 1mg% (diluir a solução estoque de azul de Evans a 1:10 em PBS-Tween 80). Incubar novamente por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , lavar as lâminas em PBS como acima e, em seguida, rapidamente, em água destilada.

A diluição de uso do conjugado deve ser determinada no próprio laboratório e para cada tipo de teste em que for utilizado. Para esse fim, titula-se um soro reagente com diluições crescentes do conjugado (titulação em Bloco ou **chess-titration**). Ocorrerá que, para as maiores concentrações do conjugado serão observados títulos constantes para o soro, mas que a partir de certa diluição em diante, serão progressivamente menores. A diluição de uso do conjugado deverá estar na zona de reatividade máxima, que fornece os títulos mais altos do soro, imediatamente anterior à diluição que precede a queda de títulos.

No exemplo da figura 1, observa-se reatividade máxima até a diluição de 1:200 do conjugado, recomendando-se utilizar nos testes a diluição de 1:100. É evidente que nessa diluição não deverá haver qualquer coloração nas reações controle, como soro não reagente ou apenas com o diluente, observando-se reação de (1+) com o soro controle de reatividade mínima.

##### Leitura dos testes:

Os preparados devem ser examinados sob luz branca, em campo escuro, para confirmação da presença de treponemas, e em seguida por fluorescência. Para os soros reagentes, atribuem-se valores de (1+) a (4+) à reação, segundo a intensidade da coloração, tendo-se como referência as reações de um soro controle fortemente reagente (4+) e do soro controle de reatividade mínima (1+). Reações duvidosas ( $\pm$ ), de treponemas no limiar da visibilidade, de coloração muito discreta e sem brilho, ou negativas (0), em que os trepone-

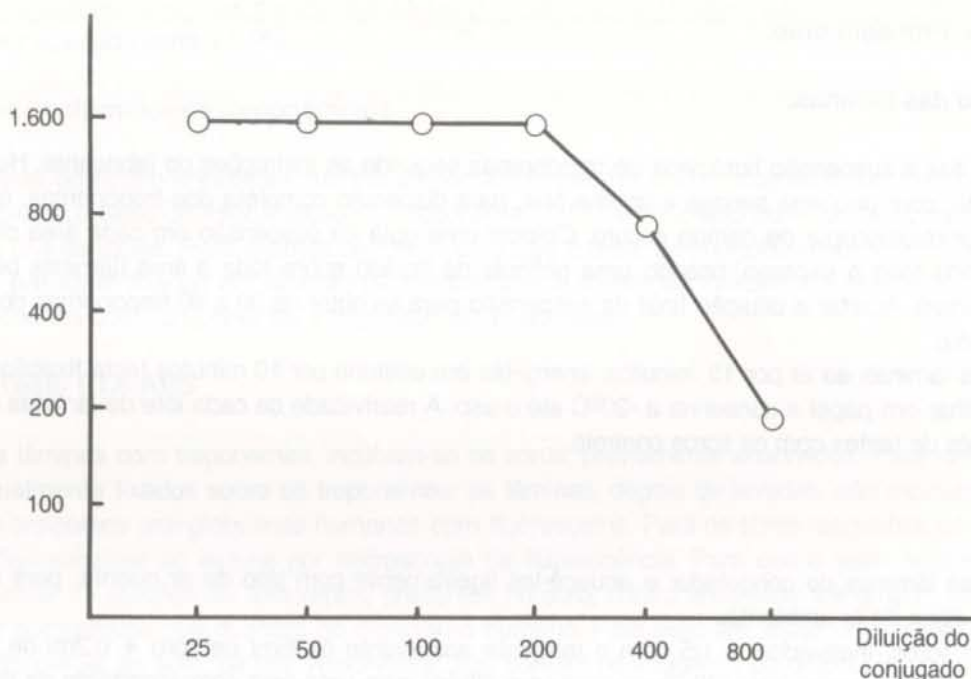


Fig. 1 – Titulação do Conjugado

mas não são visualizados à fluorescência embora observados ao exame de campo escuro, correspondem a soros não reagentes. Testes com (1+) ou ( $\pm$ ) devem ser repetidos em nova amostra de soro, para confirmação do resultado.

#### Expressão dos resultados do teste FTA-ABS

Leitura	Intensidade de fluorescência	Resultado
4+	Muito intensa	Reagente
3+	Intensa	
2+	Moderada	
1+	Equivalente ao controle de reatividade mínima	Reatividade mínima
<1+ ( $\pm$ )	Coloração no limiar de visibilidade	Não reagente
0	Ausente	

#### 2.2.2. Teste de microemaglutinação (MHATP)

Em placas plásticas de microtitulação, diluições de soros previamente tratados com reagente absorvente para remover reações inespecíficas, são incubadas com suspensão de hemácias recobertas com antígenos do *T. pallidum*. Para os soros reagentes observa-se aglutinação das hemácias, que formam um tapete nas paredes das cavidades da placa. Para os soros não reagentes as hemácias não se aglutinam e depositam-se como um botão no fundo das cavidades.

Dois tipos de reagentes são mais comuns. O teste "Sera-Tek-Treponemal Antibody" (Ames Division, Miles Laboratories, Inc., USA) utiliza hemácias de carneiro em suspensão liofilizada e placas com cavidades de fundo redondo. O teste "Hemapallidum" (Biolab Diagnóstica S/A, Brasil), emprega hemácias de aves em

suspensão líquida e placas com cavidades cônicas. A execução, leitura e interpretação dos testes devem obedecer rigorosamente às instruções dos fabricantes. Contando com reagentes já padronizados na origem, o teste MHATP não solicita os cuidados de padronização que o teste FTA-ABS exige em cada laboratório e assim está menos sujeito a variações inter-laboratórios.

### 2.3. Interpretação dos testes sorológicos

Os testes de cardioplipina têm elevada sensibilidade, de cerca de 70 a 80% na sífilis primária e praticamente total nas sífilis secundária e latente recente. Já na sífilis tardia, sintomática ou não, a sensibilidade fica em torno de 70%. Além das vantagens de fácil execução e baixo custo, os testes de cardioplipina permitem o acompanhamento da terapêutica, através das variações de títulos e mesmo negatificação. Entretanto, estes testes estão sujeitos a resultados positivos falsos, as chamadas reações falso-positivas biológicas, observadas em várias patologias em porcentagens que variam de 3 a 40% ou mais. Desse modo, com frequência seus resultados positivos precisam ser confirmados pelos testes treponêmicos, cuja especificidade é da ordem de 99%. Os testes de cardioplipina são, pois, considerados como de primeira linha na sorologia da sífilis, enquanto que os testes treponêmicos, de maior custo e complexidade, devem ser utilizados somente como testes confirmatórios de testes lipídicos positivos. Outra eventualidade para seu uso é nos casos clinicamente suspeitos de sífilis tardia com testes de cardioplipina negativos, fase da doença em que os testes treponêmicos mostram sensibilidade de 98% ou mais.

Desde que os anticorpos treponêmicos tendem a permanecer mais longamente do que os anticorpos lipídicos e quando respondem à terapêutica o fazem muito lentamente, não há interesse em sua titulação. Assim, somente realizam-se testes treponêmicos qualitativos.

O quadro 1 indica as interpretações possíveis dos resultados de testes sorológicos para a sífilis.

É necessário ter em mente que os resultados dos testes sorológicos fornecem resultados de probabilidade que juntamente com os dados clínicos irão contribuir para o diagnóstico. Também, os testes atuais não permitem distinguir entre sífilis ativa (tratada ou não) e sífilis inativa (adequadamente tratada).

QUADRO 1  
SÍFILIS – INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS SOROLÓGICOS

Testes		Conclusão
De Cardioplipina	Treponêmicos	
Reagente	Reagente	Sífilis
Reagente	Não reagente	Teste falso-positivo biológico
Não reagente	Reagente	Sífilis primária Sífilis tardia Sífilis tratada Teste falso-negativo (prozona) Teste falso-positivo
Não reagente	Não reagente	Ausência de sífilis Sífilis pré-sorológica



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centers for Disease Control - Guidelines for evaluation and acceptance of new syphilis serology tests for routine use. Department of Health, Education and Welfare, USA, 1977.
2. HOLMES, K.K. et alii. Syphilis serology and darkfield microscopy and management of reactive serology in "Sexually Transmitted Diseases", McGraw-Hill Book Co., New York, 1984, pg. 313-875.
3. Centers for Disease Control - Darkfield microscopy for the detection and identification of **Treponema pallidum**. Department of HEA, Public Health Service, 1962.
4. Centers for Disease Control - The Laboratory Aspects of Syphilis, Department of HEA, Public Health Service, 1972.
5. LARSEN, S.A.; Beck-Sague, C.M. - Syphilis in "Laboratory Diagnosis of Infections Disease, Principles and Practice", ed. Balows, A.; Hanger Jr., W.J.; Ohashin, M.; Turano, A., Spinger-Verlay, N.Y., 1988, pg. 490-503.
6. WEIS Bentzon, M.; Krag, P. - The international standard for human syphilitic serum - Bull. Wld. Hlth. Org., **24**: 257-264, 1961.
7. LARSEN, S.A. et alii. - Staining intensities in the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-ABS) test: association with the diagnosis of syphilis - Sexual Transm. Dis., **13**: 221-227, 1986.
8. CAMARGO, M.E. - A sífilis avança. Progride o diagnóstico? Rev, Ass. Med. Brasil, **34**: 19-23, 1988.

**MÓDULO II**  
**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA GONORRÉIA**

## GONORRÉIA

Doença de transmissão sexual causada pela bactéria **Neisseria gonorrhoeae**, epidêmica, incidência elevada entre adolescentes e adultos jovens. Apesar de ser uma doença infecciosa primariamente do trato urogenital, pode evoluir para complicações tais como salpingites, bartolinites, epididimites, abscessos periuretrais e disseminar sob a forma de artrites, lesões cutâneas e septicemia. A **N. gonorrhoeae** pode ainda infectar as mucosas anal, do orofaringe e da conjuntiva.

## MÓDULO II

### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA GONORRÉIA

#### 1. COLHEITA DA AMOSTRA CLÍNICA

O diagnóstico laboratorial da gonorréia, depende da demonstração de diplococos Gram-negativos em esfregaços corados e da identificação da *N. Gonorrhoeae* em meios de cultura específicos.

A eficácia do diagnóstico depende de como a amostra foi **colhida, preservada, transportada e semeada**.

##### 1.1. Colheita de amostra na mulher

###### 1.1.1. Canal endocervical (é o melhor local para colheita):

- a) introduzir o espéculo vaginal esterilizado, umedecido com água; não usar lubrificantes porque estes inibem o crescimento dos gonococos;
- b) remover o muco cervical com algodão esterilizado, sustentando-o com uma pinça;
- c) introduzir o "swab" (zaragatoa) esterilizado no canal endocervical; girar delicadamente, aguardar 10 a 30 segundos e retirar;
- d) semear a amostra em meio de cultura (tipo Thayer Martin), ou conforme o caso, acondicionar em meio de transporte (tipo Amies);
- e) repetir o procedimento com novo "swab" (zaragatoa) e fazer dois esfregaços em lâminas previamente limpas e identificadas.

###### 1.1.2. Canal anal

- a) introduzir o "swab" (zaragatoa) esterilizado no canal anal;
- b) girar o "swab" (zaragatoa) de um lado para outro, deixando 10 a 30 segundos nessa região;
- c) fazer como na letra **d** do item 1.1.1;
- d) repetir o procedimento caso o "swab" (zaragatoa) toque nas fezes.

###### 1.1.3. Canal uretral (a cultura é indicada em casos sugestivos de uretrite e/ou em pacientes adultas sem endocérvice, submetidas à histerectomia).

- a) comprimir a uretra, pressionando com o dedo médio através da parede vaginal, de modo a expulsar a secreção das glândulas para-uretrais.  
Usar "swab" (zaragatoa) esterilizado para obter a amostra.
- b) proceder como no item 1.1.1, letras **d** e **e**.

###### 1.1.4. Canal vaginal (a cultura é indicada para crianças quando se torna impossível a obtenção de amostra do endocérvice).

- a) introduzir o "swab" (zaragatoa) na vagina, girar delicadamente, deixando nessa região durante 10 a 30 segundos, retirando em seguida;
- b) proceder como no item 1.1.1, letras **d** e **e**.

1.1.5. **Orofaringe** (a cultura é recomendada quando há suspeita de infecção gonocócica disseminada e em indivíduos que praticam o sexo oral).

- a) aplicar o "swab" (zaragatoa) na faringe posterior e nas criptas tonsilares;
- b) proceder como no item 1.1.1, letra **d**.

## 1.2. Colheita de amostra no homem

### 1.2.1. Canal uretral

- a) realizar uma anti-sepsia de glânde e meato uretral externo com auxílio de gaze esterilizada umedecida em solução fisiológica esterilizada;
- b) introduzir o "swab" (zaragatoa) na uretra cerca de 1 a 2cm, girando-o delicadamente, retirá-lo a seguir;
- c) preparar dois esfregaços, identificando-os corretamente;
- d) colher amostra para cultura, conforme o item 1.1.1, letra **d**, caso haja suspeita clínica de resistência a antibióticos.

**Obs.:** Havendo dificuldades de se recuperar a **N. gonorrhoeae** das amostras citadas, utilizar uma ou mais das seguintes alternativas para cultura e bacterioscopia:

- sedimento do primeiro jato da primeira urina da manhã;
- secreção uretral obtida introduzindo "swab" 1-2cm na uretra, girando-o de um lado para outro.

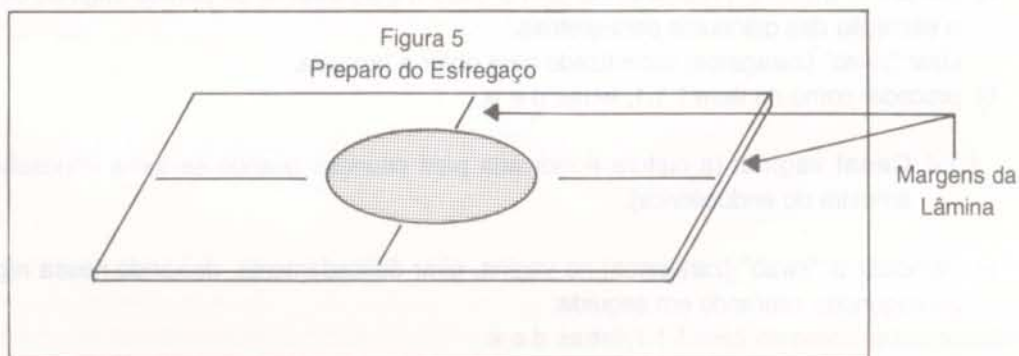
## 2. EXAME BACTERIOSCÓPICO DIRETO

O exame bacterioscópico direto é feito da amostra clínica recém-colhida do paciente. É um exame presuntivo, mas que pode ter valor de diagnóstico em uretrites gonocócicas, sobretudo a masculina; em todas as demais manifestações da gonorréia faz-se necessário o exame comprobatório da cultura.

### 2.1. Preparo do Esfregaço

A lâmina de vidro para microscopia deve estar limpa, desengordurada sem arranhões e previamente identificada:

- realizar o esfregaço da secreção, cuidando-se para obedecer as margens da lâmina (figura 5);
- fazer um esfregaço homogêneo não denso, girando o "swab" (zaragatoa) delicadamente sobre a superfície central da lâmina (figura 5);
- deixar secar à temperatura ambiente;
- passar a lâmina três vezes sobre a chama do bico de Bunsen, para fixá-lo, não permitindo que a lâmina aqueça excessivamente.



## 2.2 Coloração pelo método de Gram (Anexo I: Preparo dos Reagentes):

- cobrir o esfregaço com cristal violeta por 1 minuto;
- lavar em água corrente;
- colocar a solução de lugol por 1 minuto;
- lavar em água corrente;
- descorar com álcool – acetona 1:1;
- lavar em água corrente;
- cobrir o esfregaço com solução de fuccina 1:10 durante 30 segundos;
- lavar rapidamente em água corrente. Deixar secar à temperatura ambiente.

## 2.3. Leitura das Lâminas:

- examinar o esfregaço pós coloração de Gram, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 x) do microscópio;
- observar vários campos microscópicos, para se ter uma visão global da amostra;
- anotar em livro de registro apropriado as estruturas morfotintoriais observadas (microorganismos e células), quantificando-as;
- liberar os laudos, conforme orientação assinalada no item 6, deste Manual.

## 3. SEMEADURA DA AMOSTRA CLÍNICA

### 3.1. Meios de cultura comumente usados:

- Thayer-Martin modificado (Anexo 02);
- Martin-Lewis.

As placas de Petri (80 x 15mm), contendo meio de cultura, devem ser guardadas à 4°C (refrigerador) sempre protegidas em saco plástico. Elas devem ser colocadas com a tampa da placa voltada para baixo e devem ser usadas antes da data de expiração.

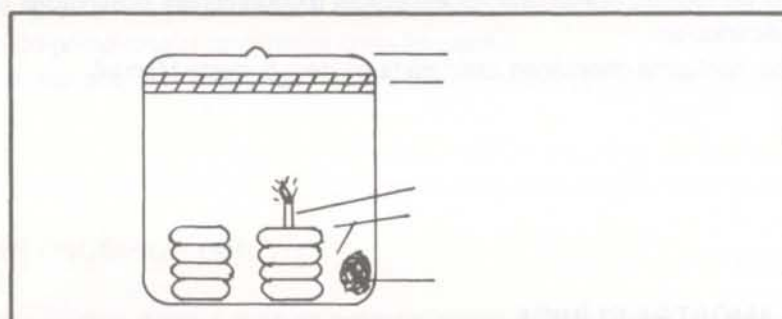
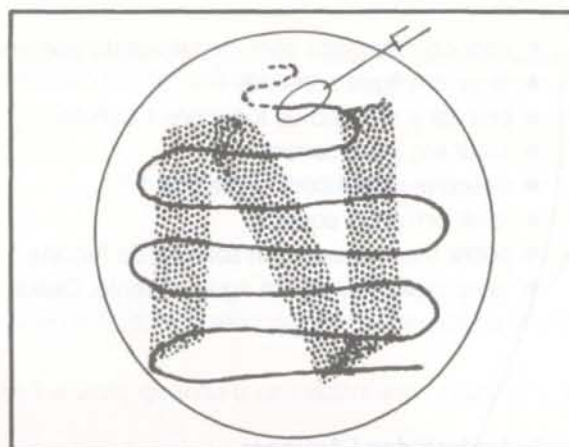
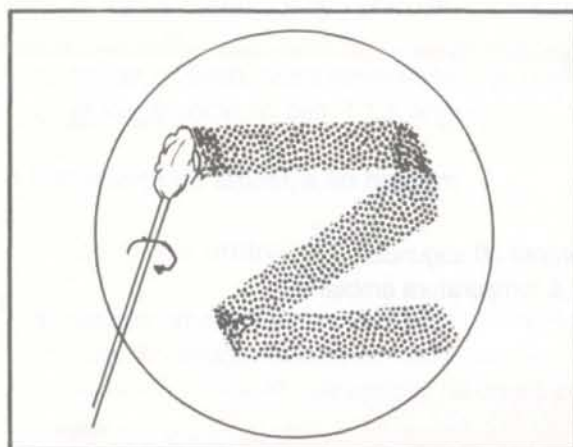
Antes da incubação das amostras, as placas devem estar à temperatura ambiente (22-25°C).

### 3.2. Técnica de Semeadura:

- girar o "swab" (zaragatoa) na superfície do meio em forma de Z (figura 01);
- usar uma alça bacteriológica de platina, espalhar o material semeado na placa, fazendo estrias próximas umas das outras (figura 2).

### 3.3. Incubação das Placas:

- colocar as placas, com as tampas para baixo, em câmara úmida de microaerofilia (5 a 10% de CO<sub>2</sub>) ou em "jarra da vela". Utilizando a "jarra da vela" fechar a lata hermeticamente, contendo no seu interior uma vela acesa e uma chumaço de algodão embebido em água (figura 3).



- Incubar as placas na estufa a 35-36°C, durante 24 a 48 horas.

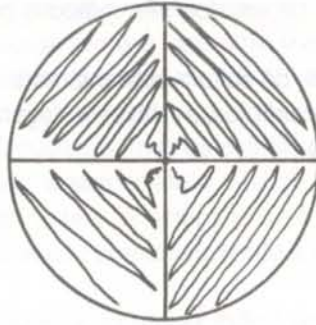
#### 4. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA

- Examinar o aspecto morfológico das colônias;
- No isolamento recente, as colônias de gonococos geralmente são brilhantes, mucóides, acinzentados, de tamanho variável;
- Realizar o teste de citocromo-oxidase (anexo 03);
- "pescar" uma colônia, fazer esfregaço e corar pelo método de Gram;
- o resultado presuntivo, informará que a bactéria isolada pertence ao gênero **Neisseria**, se o teste de oxidase for positivo e a bacterioscopia revelar presença de cocos Gram-negativos na cultura.

#### 5. IDENTIFICAÇÃO DEFINITIVA

- Dividir uma placa de Thayer Martin em quatro quadrantes. Repicar em cada quadrante, uma colônia da **Neisseria** isolada para o resultado presuntivo (figura 04);
- incubar por 24 a 48 horas, a temperatura de 35 a 36°C;
- fazer esfregaço do material de cada quadrante e corar pelo método de Gram;
- na leitura da bacterioscopia pós coloração de Gram, verificar se a cultura está pura, pela presença exclusiva de cocos Gram-negativos;
- realizar o teste de metabolização de carboidratos (anexo 04);

Figura 4  
Repicagem na placa dividida em quadrantes



- o resultado definitivo informará que a bactéria isolada, no meio de Thayer Martin, é a **Neisseria gonorrhoeae**, porque metabolizou apenas o carboidrato glicose.

## 6. LIBERAÇÃO DOS LAUDOS

### 6.1. Bacterioscopia

#### 6.1.1. Resultado negativo

Informar o seguinte: "Não foram encontrados diplococos Gram-negativos ao exame bacterioscópico pós coloração de Gram.

#### 6.1.2. Resultado positivo

No resultado positivo é importante informar a quantidade de diplococos Gram-negativos e o número de leucócitos polimorfonucleares por campo. Assim: "Presença de numerosos (ou vários, ou alguns, ou raros) diplococos Gram-negativos intracelulares (e/ou extracelulares). Polimorfonucleares acima de 30 por campo (ou: entre 20-25 p/c; entre 15 a 20 p/c; entre 10 a 15 p/c; entre 5 a 10 p/c e abaixo de 05 por campo)".

Poder-se-á liberar um laudo mais detalhado relatando a visualização de outras formas microbianas, como: cocos Gram-positivos, Bacilos Gram-negativos, Bacilos Gram-positivos, estruturas leveduriformes, etc.

### 6.2. Cultura

#### 6.2.1. Resultado negativo

Dizer que não houve crescimento de **Neisseria gonorrhoeae** em meio de T. Martin após 48 horas de observação.

#### 6.2.2. Resultado positivo

Carimbar o laudo, assim: Crescimento de **Neisseria gonorrhoeae**.

## 7. PESQUISA DE *N. Gonorrhoeae* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

Vários testes laboratoriais para detecção de **N. gonorrhoeae** resistente à penicilina e seus análogos, têm sido empregados em exames de rotina. Os testes acidométrico, iodométrico e da cefalosporina cromogênica são específicos para a detecção da enzima Beta-lactamase. O teste da difusão em ágar, utilizando-se discos de antibióticos em concentrações padronizadas (Métodos de Kirby-Bauer) pode revelar re-



sistência bacteriana a antibióticos, o que correlaciona-se com a presença da Beta-lactamase no microorganismo testado (**Haemophylus influenzae**, **Neisseria gonorrhoeae**, **Staphylococcus aureus**), entretanto, este teste deverá ser confirmado através de um dos três métodos para a pesquisa da enzima Beta-lactamase.

Esta pesquisa deverá ser feita a partir de cultura pura e jamais diretamente das secreções.

O laboratório deverá possuir cepas controles, positivas e negativas, que deverão ser testadas juntamente com as cepas dos pacientes em estudo.

## 7.1 Teste Iodométrico rápido

### Penicilina Sódica ou Penicilina G Potássica

Adicione Penicilina sódica ou Penicilina G potássica em pó a um tampão fosfato recente para obter solução com concentração final de 6.000 UI/ml. Pequenas porções desta solução podem ser distribuídas em pequenos tubos e guardadas na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Não utilizar congeladores "frost-free". Pequenas porções podem ser descongeladas e usadas pelo período de uma semana.

#### Tampão de Fosfato pH 6.0

**Solução A:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  . . . . . 0,907g  
Água destilada . . . . . 100ml

**Solução B:**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  . . . . . 0,946g  
Água destilada . . . . . 100ml

Misture 87,7ml da Solução A e 12,3ml da Solução B. Esta solução é estável por várias semanas à temperatura ambiente.

#### Solução de Penicilina

Penicilina (pó) . . . . . 0,5g  
Tampão fosfato . . . . . 83,0ml

Concentração de 6.000u/ml. Esterilize a solução de penicilina através do filtro 0,22-u ou 0,45u.

#### Solução do amido

Amido . . . . . 1,0g  
Água destilada esterilizada . . . . . 100,0ml

Misture o amido com água destilada e coloque em banho maria até o amido se dissolver. Guarde no refrigerador por até 02 dias.

#### Solução de Iodo

Iodo . . . . . 2,03g  
Iodeto de potássio . . . . . 53,2g  
Água destilada esterilizada . . . . . 100,0ml

Dissolva os ingredientes em água destilada. Armazene em garrafas escuras. Prepare solução nova se houver precipitação.

## Teste

1. Dispense 0,1ml da solução de penicilina em um tubo pequeno ou micro-placa.
2. Remova as colônias puras do microorganismo e faça uma suspensão na solução de penicilina. Misture por 30 segundos e deixe a mistura permanecer por 1 hora em temperatura ambiente a fim de que a Beta-lactamase quebre o anel Beta-lactâmico. O **H. influenzae** e a **N. gonorrhoeae** normalmente não requerem 1 hora de incubação, mas os estafilococos requerem.
3. Adicione 3 gotas da solução de amido, à suspensão e misture bem.
4. Adicione 1 gota do iodo com pipeta Pasteur. A solução irá se tornar escura devido a reação do iodo com o amido. Caso o iodo seja adicionado prematuramente a reação enzimática pode parar gerando resultado falso-negativo.
5. Agite a mistura por 1 minuto. A descoloração rápida indica produção de B-lactamase. Se a solução permanecer escura, o teste é negativo.
6. Faça o teste usando o controle positivo e negativo.

### Vantagens:

- resultado rápido;
- reagentes disponíveis e baratos;
- fácil de fazer;
- cultura original pode ser usada caso haja colônias isoladas de **N. gonorrhoeae**;
- fácil de ler.

### Desvantagens:

- muitas fases;
- reagentes instáveis;
- não pode testar secreção uretral, vaginal e cervical diretamente.

## 7.2. Teste acidométrico rápido

1. Prepare solução de vermelho de fenol a 0,5%. Dissolva 1.0g de vermelho de fenol em 30ml de NaOH1N q.s.p. para 200ml com água destilada.
2. Adicione 2.0ml da solução vermelho de fenol em 16.6ml de água destilada esterilizada.
3. Coloque esta solução em um frasco contendo 20 milhões de unidades de penicilina G potássica. É necessário tamponar; muitas preparações contém tampão citrato, o que é adequado para o teste.
4. Adicione NaOH gota após gota até que pH seja 8.5. A solução se tornará vermelha escura.
5. Dividir a solução em alíquotas pequenas, congele a -20°C.

## Teste

1. Coloque 0,5ml para 0,1ml do substrato de penicilina em um tubo pequeno. Remova várias colônias com a alça e faça uma solução turva no substrato.
2. Se a cultura produzir Beta-lactamase a solução se tornará amarela. A mudança da cor ocorrerá em 1 minuto.
3. Faça o teste usando um controle positivo e um controle negativo.

### Vantagens:

- resultado rápido e possível no mesmo dia se a cultura estiver pronta;
- reagente disponível e barato;
- fácil de fazer;
- somente uma fase;

- reagente menos estável do que o teste iodométrico;
- placas original podem ser usadas caso haja colônias isoladas.

#### Desvantagens:

- requer ajustamento correto do pH;
- o ponto final é algumas vezes difícil de definir.

### 7.3. Teste da Cefalosporina Cromogênica

1. Dissolva 10mg da cefalosporina 87/312 em 1ml de dimetilsulfoxido (DMSO). Diluir com PBS (pH 7.0) a uma concentração de 500g/ml. A solução é estável na temperatura de 4 – 10°C durante várias semanas.

Prepare o PBS (pH 7.0) da seguinte maneira:

**Solução A:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  . . . . . 0,907g  
Água destilada 100ml

**Solução B:**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  . . . . . 0,946g  
Água destilada 100ml

Misture 39,2ml da solução A (fosfato monopotássico) com 60,8ml da solução B (fosfato dissódico).

#### Teste

1. Coloque 0,05ml do substrato de cefalosporina em um tubo pequeno ou uma microplaca.
2. Usando a alça bacteriológica remova colônias do microorganismo a ser testado. Faça uma suspensão densa na solução de cefalosporina.
3. Misture por 1 minuto. Observe se há mudança de cor após 10 minutos, e após 1 hora.
4. O teste positivo é indicado pela mudança de cor do substrato de amarelo para vermelho. Cepas de **N. gonorrhoeae** e **H. influenzae** produtores de Beta-lactamase, normalmente produzirão mudança de cor em menos de 10 minutos.
5. Faça o teste com controles positivos e negativos.

#### Vantagens:

- pode ser usado no trabalho de campo, simples, fácil de fazer;
- reagentes são estáveis;
- resultados disponíveis no mesmo dia da cultura;
- o teste pode ser feito nas placas de agar.

#### Desvantagens

- dificuldade para encontrar a cefalosporina cromogênica.

## 8. ESTOCAGEM DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

- Repicar a cultura pura obtida no meio de Thayer Martin Modificado (TMM) em placa de agar chocolate;
- Incubar por 24 horas, a 35 – 36°C;
- Fazer esfregaço e Gram para confirmar a pureza da cultura;

#### a) *Cultura padrão:*

- semear a cultura padrão no agar chocolate; incubar a 35 – 36°C durante 16 – 20 horas em CO<sub>2</sub>;
- preparar uma suspensão do crescimento bacteriano em 0,5ml de caldo trypticase e misturar bem; adicionar 0,2ml desta suspensão em 4,5ml do mesmo caldo. Misturar bem para formar uma suspensão homogênea;
- ajustar o aparelho para uma opacidade que cai entre 45% ± 5% (transmissão de luz) em 530nm, ou a equivalente ao nº 2 da escala padrão de McFarland;
- preparar as diluições de cada cultura (45% ± 5%) da suspensão testada.
- Preparar uma suspensão densa em quatro partes de caldo TSB e uma parte de glicerina, misture bem. Distribua alíquotas de 0,5 a 1ml em tubos apropriados para estocagem;
- Congelar a -70°C;
- Repicar as amostras estocadas após 6 meses, em ágar chocolate. Não use o meio de TMM para recuperar amostras congeladas, mas ágar chocolate enriquecido e sem inibidores.

## 9. CONTROLE DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE DST

### 9.1. Controle de qualidade do Método de Gram

#### Microorganismos necessários:

- *Neisseria gonorrhoeae*;
- *Staphylococcus epidermidis*.

#### Procedimento:

1. colocar uma gota de solução fisiológica na lâmina;
2. retirar uma colônia suspeita de *N. gonorrhoeae* e fazer o esfregaço;
3. repetir os itens 1 e 2, usando a colônia suspeita de *S. epidermidis*;
4. corar os esfregaços pelo Gram;
5. observar no microscópio a morfologia e coloração:

- *N. gonorrhoeae* = cocos Gram – negativos;
- *S. epidermidis* = cocos Gram – positivos.

6. caso a coloração não seja específica, verifique os reagentes e reavalie a técnica de elaboração do esfregaço e/ou da coloração.

### 9.2. Controle de qualidade do meio de Thayer Martin Modificado (TMM)

#### Microorganismos necessários:

- Cepas-padrão de *Neisseria gonorrhoeae* dependentes de CO<sub>2</sub>;
- *Neisseria meningitidis*;
- *Proteus* sp;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus epidermidis*;
- *Neisseria sicca*;
- *Cândida albicans*.

### Meios de cultura utilizados:

- Agar chocolate;
- Thayer Martin Modificado;
- Caldo Trypticase de Soja (TSB)

### Procedimento:

- determinar a Diluição Ótima do Inóculo (DOI) para cada microorganismo a ser testado (o inóculo deverá fornecer 50 a 100 colônias no ágar chocolate, usando alça bacteriológica de 3mm).

### Exemplo:

TUBO Nº	TSB	SUSPENSÃO DA CULTURA	DILUIÇÃO DO INOCULUM	
1	4,5ml	0,5ml da suspensão a (45% ± 5%)	1:10	(10 <sup>-1</sup> )
2	4,5ml	0,5ml do tubo 1	1:100	(10 <sup>-2</sup> )
3	4,5ml	0,5ml do tubo 2	1:1000	(10 <sup>-3</sup> )
4	4,5ml	0,5ml do tubo 3	1:10.000	(10 <sup>-4</sup> )
5	4,5ml	0,5ml do tubo 4	1:100.000	(10 <sup>-5</sup> )
6	4,5ml	0,5ml do tubo 5	1:1000.000	(10 <sup>-6</sup> )

- inocular as placas de ágar chocolate usando uma alça de 3mm para cada diluição;
- examinar as placas após 16 - 20 horas. A diluição de 10<sup>-3</sup> ou 10<sup>-4</sup> é satisfatória para grande parte dos microorganismos;
- inocular a placa controle do novo lote de T. Martin Modificado com uma alça bacteriológica de 3mm;
- repetir o procedimento em placas de agar chocolate com as mesmas diluições para verificar a viabilidade do meio;
- incubar em atmosfera de CO<sub>2</sub>, a 35-36°C por 24 - 48 horas;
- examinar as culturas, comparar o crescimento, a inibição do crescimento, a reação de oxidase na placa controle e nas outras placas, registrando todos os dados em fichas apropriadas;
- se necessário revisar os achados e determinar se o novo meio reúne os critérios de aceitação.

### Outros microorganismos

Para os demais microorganismos (*Proteus sp*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *N. sicca*, *C. albicans*), basta utilizar a diluição 10<sup>-3</sup> ou 10<sup>-4</sup> (escala nº 2 de McFarland); faça como está indicado nas letras c, d, e, da cultura padrão. Estes microorganismos deverão ter crescimento inibido no meio de TMM.

#### 9.2.1. Preparo da Escala Padrão de McFarland

- Coloque 10 tubos em uma estante, marque-os de 1 a 10.
- Adicione a seguinte quantidade da solução cloreto de bário (1%):

Tubo nº 1	.....	0,1ml
Tubo nº 2	.....	0,2ml
Tubo nº 3	.....	0,3ml
Tubo nº 4	.....	0,4ml
Tubo nº 5	.....	0,5ml
Tubo nº 6	.....	0,6ml
Tubo nº 7	.....	0,7ml
Tubo nº 8	.....	0,8ml
Tubo nº 9	.....	0,8ml
Tubo nº 10	.....	1,0ml

3. Adicione em cada tubo quantidade suficiente de solução de ácido sulfúrico (1%) até completar 10ml de solução.
4. Feche bem os tubos e sele com parafina.
5. Quando o precipitado de cor branca (sulfato de bário) se formar em cada tubo, a densidade deles será diferente.
6. A densidade de cada tubo corresponde aproximadamente ao seguinte número de bactérias por ml:

Nº 1	.....	300.000
Nº 2	.....	600.000
Nº 3	.....	900.000
Nº 4	.....	1.200.000
Nº 5	.....	1.500.000
Nº 6	.....	1.800.000
Nº 7	.....	2.100.000
Nº 8	.....	2.400.000
Nº 9	.....	2.700.000
Nº 10	.....	3.000.000

**Notas:**

Quando a curva acima for usada para comparar ou ajustar suspensão bacteriana em caldo, prepare solução de ácido sulfúrico a (1%) no mesmo caldo.

Os tubos devem ser do mesmo tamanho.

**TESTE PARA CRESCIMENTO**

**a) Cultura padrão**

ORGANISMO CEPA	Nº DOI	CO <sub>2</sub> DEPEN	VIABILIDADE AC	MEIO AMBIENTE		NOVO MEIO		OXIDASE
				24hs	48hs	24hs	48hs	
1. N. gonorrhoeae								
2. N. gonorrhoeae								
3. N. gonorrhoeae								
4. N. gonorrhoeae								
5. N. gonorrhoeae								
6. N. gonorrhoeae								
7. N. gonorrhoeae								
8. N. meningitidis								

**TESTE PARA INIBIÇÃO DE SAPRÓFITAS**

**b) Outros microorganismos**

MICROORGANISMO CEPA	Nº	DOI	VIABILIDADE AC	MEIO CONTROLE	NOVO CONTROLE
1. Proteus spp					
2. E. coli					
3. S. epidermidis					
4. N. sicca					
5. C. albicans					

Responsável pelo teste:

Data: / /

### 9.3 Controle de qualidade dos Carboidratos

Microorganismos necessários:

- *Neisseria gonorrhoeae*;
- *Neisseria meningitidis*;
- *Neisseria lactâmica*;
- *Neisseria sicca*.

Procedimentos:

- preparar 4 baterias contendo os seguintes açúcares: glicose, lactose, levulose (frutose), maltose e sacarose;
- semear em cada bateria uma das neisserias acima;
- incubar a 35-36°C, por 24 horas, sem tensão de CO<sub>2</sub>;
- anotar a utilização de açúcar em cada bateria. O resultado deverá ser o seguinte:

- **N. gonorrhoeae** = glicose +
- **N. meningitidis** = glicose e maltose +
- **N. lactâmica** = glicose, maltose e lactose ou (ONPG) +
- **N. sicca** = glicose, levulose, maltose e sacrose +.

### 9.4. Controle de qualidade da prova de oxidase

Microorganismos utilizados:

- *Neisseria sp*;
- *Staphylococcus sp*.

Aspecto do reagente:

- Sem sinais visíveis de oxidação.

Procedimentos:

- pingar uma gota do reagente de oxidase em duas tiras de papel de filtro;
- em uma das tiras passar uma colônia de *neisseria sp* e, na outra, uma colônia de *Staphylococcus sp*, com auxílio de uma **alça de platina** (não utilizar alça de níquel cromo ou similar);
- o teste será considerado satisfatório se aparecer cor rosada na tira contendo *Neisseria sp* e nenhuma alteração de cor na tira contendo *Staphylococcus sp*.

## ANEXO I REAGENTES PARA COLORAÇÃO DE GRAM

1. Solução de Cristal-Violeta modificada por Hucker.

**Solução A:**

Cristal Violeta .....	2,0g
Álcool etílico P.A. ....	20ml

### Solução B:

Oxalato de amônia .....	0,8g
Água destilada .....	80ml

Após 24 horas, misturar a solução A com a solução B. Estocar em garrafas de vidro de cor âmbar.

### 2. Solução de Lugol (solução estoque).

Iodo P.A. ....	1,0g
Iodeto de potássio .....	2,0g
Água destilada .....	200ml

Colocar o iodo e o iodeto dentro de um graal, adicionar o iodo e triturar por 10-30 segundos. Adicionar 1ml de água destilada, triturar, acrescentar mais 5ml de água destilada, triturar, adicionar 10ml de água destilada e triturar. Colocar a solução de iodo/iodeto de potássio numa proveta e completar o volume para 200ml. Guardar em frascos âmbar.

Para uso, diluir a solução estoque em 1:15 de água destilada.

### 3. Álcool – Acetona:

Álcool etílico P.A. ....	250ml
Acetona P.A. ....	250ml

Misturar e estocar em frasco de vidro.

## ANEXO II

### MEIO DE CULTURA DE THAYER MARTIN MODIFICADO (TMM)

#### Preparação (1 litro)

1. Preparar a solução de hemoglobina a 2% da seguinte maneira: suspender 10g de hemoglobina desidratada em 500ml de água destilada, misturar bem por 10 minutos. Filtrar a solução de hemoglobina através de gaze;
2. Pesar 36g do meio base para gonococo (GC) e 10g de ágar purificado, misturar, suspender em 500ml de água destilada. Levar ao banho-maria fervente para clarificação do agar;
3. Autoclavar a solução de hemoglobina e o meio GC agar, em frascos separados, a 121°C, por 15 minutos;
4. Esfriar o material a uma temperatura de 56°C, mantendo-o em banho-maria regulado;
5. À parte, reconstituir a solução de antibióticos VCNT (Vancomicina, colistina, nistatina e trimetropina) em água destilada esterilizada e deixar repousar durante 20 minutos;
6. Reconstituir o suplemento VX com o líquido reidratante; agitar bem para se obter solução homogênea;
7. Asepticamente, adicionar 10ml dos antibióticos, 10ml do suplemento VX, 5ml de solução de glicose a 2,5% esterilizada (por vapor fluente ou filtração), ao meio base GC agar, misturando suavemente;
8. Acrescentar a solução de hemoglobina no meio GC agar, delicadamente para se evitar formação de bolhas. Homogeneizar. Medir o pH, que deve ser de  $7,2 \pm 0,2$ ;
9. Distribuir 15 a 20ml do meio TMM em placas de Petri;
10. Deixar as placas em temperatura ambiente por uma noite. Retirar uma amostragem de cada lote e incubar em estufa a 23-27°C e 35-36°C por até uma semana;
11. Acondicionar as placas em sacos plásticos e estocá-las em refrigerador por até 3 semanas;
12. Preencher a Ficha de Controle de Qualidade do Meio de TMM e anotar os dados sobre o teste esterilidade e aparência do meio. (ver abaixo).



## FICHA DE CONTROLE DE QUALIDADE

Thayer Martin Modificado

Nº do lote:

Data do preparo

Data do teste

Data do resultado

### INGREDIENTES

MARCA	Nº DO LOTE	MARCA	Nº DO LOTE
GC-Base		VCN	
Ágar		DEXTROSE	
Hemoglobina			
Suplemento VX			

TESTE DE ESTERILIDADE  
INCUBAÇÃO POR UMA SEMANA

APARÊNCIA

pH a 56°C

23 - 27°C	35 - 36°C	CONSISTÊNCIA*	( ) ( )
C	AC	HOMOGENEIDADE*	( ) ( )
		UMIDADE*	( ) ( )
		OUTROS	( ) ACEITÁVEL
		(ESPECIFICAR)	( ) NÃO ACEITÁVEL
			DATA DE EXPEDIÇÃO

\* (+): adequada

(-): inadequada

C = Crescimento; AC = Ausência de crescimento

Nome da pessoa que realizou o teste

### ANEXO III

#### TESTE DA ENZIMA CITOCROMO-OXIDASE

Os citocromos são hemoproteínas que contêm ferro e atuam como o último estágio da cadeia respiratória aeróbia, transferindo hidrogênio (elétrons) ao oxigênio, com formação de água. As *Neisserias* e as muitas espécies de *Pseudomonas* são oxidase - positivas.

A prova de citocromo-oxidase utiliza certos reativos que produzem cor e que atuam como receptores de elétrons, substituindo o oxigênio. A parafenilediamina é incolor no estado reduzido, mas em presença de citocromo-oxidase, o oxigênio atmosférico se oxida e origina cor rosada.

#### Reagente:

- solução de hidrocloreto de dimetil-parafenodiamina a 1%. Esta solução deve ser preparada mensalmente e conservada a 4°C (refrigerador) em frasco âmbar.

#### Procedimentos: (técnica indireta)

- pingar uma gota do reagente de citocromo-oxidase em uma tira de papel de filtro;
- retirar uma colônia e espalhar na tira do papel de filtro;
- a reação positiva é imediata com o surgimento de coloração rosa no local onde se espalhou a colônia.

**Obs.:** utilizar alça de platina no teste.

#### Controles:

- positivo: *Pseudomonas aeruginosa*
- negativo: *Escherichia coli*.

## ANEXO IV METABOLIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS

A *N. gonorrhoeae* é uma bactéria aeróbia que realiza a glicólise através da via aeróbia ou via metabólica de Entner-Doudoroff, oxidando a glicose em 6 – fosfogluconato e 2 – ceto – 3 – desoxi – 6 – fosfogluconato, até a formação de ácido pirúvico. É uma reação produtora de energia (ATP) que requer oxigênio molecular como receptor final de hidrogênio (elétrons). Entre os carboidratos testados para identificação definitiva das *neisserias*, a glicose é único metabolizado pela *N. gonorrhoeae*.

### 1. Preparo dos carboidratos

- Em cinco balões numerados adicionar 100ml de água destilada em 4,3g do meio base desidratado CTA (Cystine trypticase Agar). Misturar e aquecer, até a dissolução do agar (clarificação), em banho-maria;
- Adicionar em cada balão um tipo específico de carboidrato a 1%: glicose, lactose, levulose, maltose e sacarose;
- Distribuir em tubos de rosca de 12 x 120mm;
- Esterilizar por filtração ou vapor fluente (100°C, durante 30 minutos, em autoclave com a válvula aberta).

### 2. Inoculação dos carboidratos

1. Preparar uma bateria contendo os cinco tipos de açúcares (glicose, lactose, levulose, maltose e sacarose), identificando o exame;
2. Inocular uma colônia de *Neisseria* suspeita, certificando se proveniente de cultura pura;
3. A inoculação deve ser feita em profundidade, no mínimo 1cm abaixo da superfície do meio, com auxílio de uma alça bacteriológica;
4. Incubar à temperatura de 35-36°C, por 24 e 48 horas. É dispensável a tensão de CO<sub>2</sub>;
5. Na metabolização de carboidratos, haverá produção de ácidos que serão percebidos pela viragem no indicador de vermelho para amarelo;
6. A prova será considerada positiva para *Neisseria gonorrhoeae* se apenas a glicose for metabolizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRANCHINI, M.: *Procedimentos Laboratoriais no Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST)*. Brasília, Instituto de Saúde do Distrito Federal, 1983, pg. 89.
2. JACOBS, N.F., KRAUS, S.J.: *Gonococcal and nongonococcal urethritis in men: Clinical and laboratory Differentiation* Ann Intern. Med., **82**:7, 1975.
3. KONEMAN, E.V. et cols. *Diagnóstico Microbiológico, Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1ª ed., 1983, p. 266-267 e 386-393.*
4. PHILLIPS, I.: *Beta - Lactamase - producing penicilin - resistan: gonococcus. Lancet* **2**:637, 1976.
5. SIMMOUS, P.D.: *Evaluation of the carly and first voided urine sediment in the diagnosis of urethritis. Sex. Transm, Dis.* **5**:39, 1978.
6. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control - *Criteria and Techniques for the diagnoses of Gonorrhoea* 1983, 4 p.
7. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control. *Procedures for use by the laboratory in the isolation and identification Neisseria gonorrhoeaea*, 1983, 38 p.

**MÓDULO III**  
**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DOENÇAS DE**  
**TRANSMISSÃO SEXUAL NÃO-GONOCÓCICA**

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO SEXUAL NÃO-GONOCÓCICA

Corriqueiramente, um serviço laboratorial voltado para o diagnóstico de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) atende, essencialmente, os casos de gonorréia e sífilis. No entanto, dentro de um contexto de saúde pública, não se pode desprezar ou passar para plano secundário o diagnóstico das demais DST.

Estas Doenças Sexualmente Transmissíveis seriam aquelas responsáveis por uretrites, vaginites, vulvo-vaginites, cervicites, lesões e ulcerações na genitália.

É verdade que algumas destas doenças exigem técnicas de diagnóstico laboratorial sofisticadas e onerosas, tal como ocorre no linfogranuloma venéreo. Vale a pena ressaltar, porém, que muitas delas, senão a maioria, utilizam-se de recursos simples, sensíveis e confiáveis. É o que ocorre, por exemplo, no uso de bacterioscopia à fresco para sugerir uma candidíase ou trichomoníase. A tão usual coloração segundo Gram, poderá nos orientar no diagnóstico tanto de um cancro mole quanto numa vaginite por **Gardnerella vaginalis**.

O importante é que busquemos implantar novas técnicas de diagnóstico ou aperfeiçoar as existentes, para que se possa, efetivamente, contribuir para o controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, em nosso País.

## 1. CANCRO MOLE

O cancro mole é uma doença de transmissão sexual, cujo agente etiológico, o *Haemophilus ducreyi* produz uma ulceração dolorosa, sumamente contagiosa, geralmente localizada na genitália externa.

### 1.1. Coleta da amostra clínica para bacterioscopia:

- limpar a úlcera com solução fisiológica esterilizada;
- colher material da região ulcerada com auxílio de um "swab" (zaragatoa);
- realizar esfregaços (2 a 3), utilizando lâminas limpas e secas;
- secar à temperatura ambiente;
- corar pelo Método de Gram.

### 1.2. Coleta da amostra clínica para cultura:

Utilizar amostra clínica colhida como para bacterioscopia, semear em agar chocolate enriquecido com os fatores V(NAD) e X (hemina) ou Agar de Levinthal e incubar por 24 a 48 horas a 35°C, em atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> (câmara de microaerofilia). A identificação da bactéria se faz pela prova de requerimento de fatores (X ou V) e pela hemólise em agar sangue. A bactéria pode crescer bem na água de condensação do meio de cultura.

### 1.3. Liberação dos laudos:

#### 1.3.1. Bacterioscopia:

A coloração pelo Gram poderá revelar presença da bactéria nas lesões ulcerativas, quando se observar diminutos bacilos Gram-negativos pleomórficos agrupados com frequência no interior dos leucócitos polimorfonucleares. Extracelularmente, o *Haemophilus* poderá formar cadeias ou paliçadas.

#### 1.3.2. Cultura

O *H. ducreyi* utiliza o fator X e 90% das cepas produzem hemólise em ágar sangue de ovino.

## 2. DONOVANOSE

É uma infecção usualmente transmitida pelo contato sexual, causada pela bactéria *Calymmatobacterium granulomatis*. É uma doença de evolução crônica e de baixa contagiosidade; caracteriza-se pela presença de nódulos subcutâneos, granulomatosos, ulcerados, indolores e auto-inoculáveis; as lesões geralmente são encontradas na genitália, região perianal e região inguinal.

É provável que a donovanose possa ser transmitida na ausência de contato sexual.

## 2.1. Diagnóstico Laboratorial

### 2.1.1. Biópsia das lesões:

Para exames histopatológicos.

### 2.1.2. Esfregaço das lesões:

Corados pelo Giemsa ou Wright.

### 2.1.3. Cultura das lesões ou do aspirado dos linfonodos:

O bacilo *C. granulomatis* é de difícil cultivo, porém pode-se utilizar o meio de cultura descrito por Dient e Brownell à base de gemas de ovos frescos.

## 2.2. Liberação dos laudos

O comum do diagnóstico laboratorial da donovanose é dado pelo resultado dos exames bacterioscópicos (cortes histológicos e esfregaços corados), considerados positivos quando se visualiza células mononucleares endoteliais (macrófagos) contendo agrupamentos do bacilo, chamados **corpúsculos de Donovan**.

## 3. VAGINITE POR *Gardnerella vaginalis*

A *G. vaginalis* é um bacilo Gram-negativo ou Gram-lábil, pleomórfico que normalmente pode ser encontrado na vagina da mulher adulta, mas que poderá ser agente etiológico de vaginites ou vaginoses. Geralmente, a *G. vaginalis* encontra-se associada a bactérias anaeróbias. (*Bacteroides*, *Mobiluncus* ou cocos anaeróbios).

### 3.1. Diagnóstico laboratorial

#### 3.1.1. Teste do hidróxido de potássio:

- Em uma lâmina de vidro, pingar uma ou duas gotas de secreção vaginal;
- acrescentar uma ou duas gotas de KOH a 10%, misturar com alça bacteriológica ou palito de madeira;
- sentir o odor à peixe, que é despreendido pela presença de aminas voláteis metabolizadas pelas bactérias anaeróbias. Este cheiro característico dá como positivo o teste para **Gardnerella**.

#### 3.1.2. Teste do pH:

- A secreção vaginal mostrará uma acidez em torno de 4,5.

#### 3.1.3. Bacterioscopia do esfregaço de secreção vaginal:

- Corar o esfregaço pelo Método de Gram;
- Observar a presença de células-guia ou células-chave (clue cells): células epiteliais cobertas por diminutos bacilos Gram-negativos (ou Gram-lábeis);

Observar a ausência ou redução dos lactobacilos.

#### 3.1.4. Cultura de secreção vaginal:

Utiliza-se meio de cultura seletivo para *G. vaginalis* como o descrito por Greenwood e colaboradores, que é constituído de uma base (agar Columbia) acrescida de peptona número 3 a 1% de sangue humano a

5%, além de uma solução de citrato-fosfato-glicose. A *G. vaginalis* produz hemólise Beta.

Para identificar a bactéria, utiliza-se provas bioquímicas complementares como o teste da oxidase, catalase, mobilidade, nitrato e metabolização de carboidratos, entre outros.

### 3.2. Liberação dos laudos

Em laboratórios de saúde pública, o comum é utilizar o resultado da bacterioscopia (presença de células-chave com redução ou ausência de lactobacilos), associado ao resultado positivo do teste de KOH e medição do pH em torno de 4,5, para estabelecer o diagnóstico presuntivo deste tipo de vaginite. A identificação definitiva da *G. vaginalis* é dada pelo crescimento em meio seletivo e pelas provas bioquímicas complementares.

## 4. TRICOMONÍASE

Doença causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* na região uro-genital feminina e masculina. É uma vulvovaginite muito comum em mulheres adultas.

### 4.1. Diagnóstico laboratorial

#### 4.1.1. Teste do pH vaginal:

Geralmente o pH vaginal estará acima de 5,0. Para fazer o teste, basta colher uma gota de secreção vaginal e colocá-la numa tira de papel universal de medição de pH.

#### 4.1.2. Exame direto a fresco:

Duas a três gotas de secreção vaginal ou uretral homogeneizada em 0,1 a 0,2ml de solução fisiológica. Colocar uma gota da mistura numa lâmina, cobrir com lamínula e observar ao microscópio em objetiva de 10x e 40x.

#### 4.1.3. Exame citológico (Papanicolau)

Realizado da secreção vaginal.

#### 4.1.4. Cultura de secreção vaginal, uretral ou prostática

Em serviço público não se justifica muito o cultivo de *T. vaginalis*, uma vez que onera e atrasa os resultados laboratoriais. Um dos meios de cultivo indicado é o de Lash ou o de Feinberg, à base de hidrolizado de caseína enriquecido com soro.

### 4.2. Liberação dos laudos

Secreção vaginal ou uretral com pH acima de 5,0, associada à presença de trichomonas móveis no exame direto à fresco e/ou presença de trichomonas coradas pelo Papanicolau, estabelece o diagnóstico laboratorial da trichomoníase.

## 5. CANDIDÍASE

Vulvovaginite muito comum, sobretudo em mulheres grávidas, causada por uma levedura: *Cândida albicans*. A candidíase pode ocorrer por transmissão sexual, por contaminação a partir do sistema gastrointestinal onde habitualmente é encontrada a levedura.



## 5.1. Diagnóstico laboratorial

### 5.1.1. Esfregaço da secreção vaginal.

Que deverá ser corado pelo Método de Gram ou pelo Método de Giemsa.

### 5.1.2. Bacterioscopia direta à fresco:

Diluir uma gota da secreção vaginal em uma gota de solução fisiológica ou KOH a 10%. Cobrir com laminula e observar ao microscópio no aumento de 40x.

### 5.1.3. Cultura e identificação da espécie:

O meio mais simples para crescimento de leveduras é o Sabouraud. A identificação pode ser feita pela formação do tubo germinativo e provas complementares, como a de fermentação e assimilação de carboidratos e a produção de clamidospores em ágar farinha de milho (fubá).

## 5.2. Liberação dos laudos

A presença de leveduras, fortemente coradas pelo Gram (Gram-positivos) no esfregaço vaginal, ou a observação de estruturas leveduriformes no exame microscópico à fresco, é bastante sugestivo de candidíase

Na impossibilidade do laboratório possuir recursos para realização de provas complementares mais apuradas, que identificarão a *C. albicans* e grande variedade de leveduras, recomenda-se a seguinte prova para observação do tubo germinativo:

- retirar uma porção de uma colônia isolada de levedura, utilizando alça bacteriológica;
- suspender em 0,5ml de soro humano ou de coelho, em tubo de ensaio. Homogeneizar;
- incubar o tubo a 37°C por 3 horas, no máximo;
- retirar uma gota da suspensão levedura – soro e colocá-la sobre uma lâmina limpa. Cobrir com laminula;
- observar ao microscópio (aumento de 40x) a presença de tubo germinativo característico de *C. albicans*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FILHO, José Trindade. Donovanose. In: *Doenças Sexualmente Transmissíveis*, 2ª ed. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro, 1987, p. 85-90.
2. FINEGOLD, M.S. & BARONI, E.I. Genus calymmatobacterium. In: *Diagnostic Microbiology*, Seventh edition, Bayley and Scott's, United States of America, 1982, p. 565-566.
3. .Genital and sexually transmitted pathogens, p. 295-296.
4. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL, U.R. & SOMMERS, H.M. Haemophilus. In: *Diagnóstico Microbiológico*. Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1ª ed., 1983, p. 250-251.
5. .Identificación de las levaduras, p. 455.

## 6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS DST CAUSADAS POR *Chlamydia trachomatis*

As clamídias, atualmente, classificadas como bactérias, são parasitas obrigatórios de células eucarióticas(5). Não possuindo certos compostos envolvidos na produção de energia, dependem do aparato energético da célula hospedeira para o desenvolvimento do seu ciclo biológico.

Podemos identificar duas formas distintas nesse ciclo: o corpúsculo elementar (CE) e o corpúsculo reticular (CR). O CE, com 0,3 $\mu$ , de diâmetro, é a forma infectante e que resiste ao meio extracelular. Ao penetrar na célula, ele se diferencia em CR (1 $\mu$  de diâmetro), que é a forma replicativa e metabolicamente ativa. Ao se dividir o CR dá origem a outros corpúsculos reticulares que posteriormente se diferenciarão em corpúsculos elementares. O CR é a forma estritamente intracelular e não infectante. As inclusões intracitoplasmáticas correspondem aos conjuntos de partículas do ciclo biológico da clamídia(7).

Diferentes sorotipos de *Chlamydia trachomatis* estão relacionados com o linfogranuloma venéreo e outras afecções genito-urinárias e oculares, sendo os agentes mais importantes na etiologia das uretrites não gonocócicas no homem(6). Na mulher, estão relacionados principalmente às cervicites(3), endometrites, doença inflamatória pélvica e suas complicações. Na gravidez, as infecções por clamídia podem comprometer a integridade do concepto, causando conjuntivite de inclusão, pneumonia e outras infecções do trato respiratório(1).

### Isolamento e Cultura

Pelas suas exigências energéticas, as clamídias não podem ser cultivadas em meios artificiais, sendo imprescindível a utilização de sistemas vivos, tais como linhagens contínuas de células.

A técnica de isolamento e cultura é o teste mais sensível e específico para o diagnóstico das infecções por *Chlamydia trachomatis*(2), exigindo uma infra-estrutura laboratorial para o cultivo de células. É por isso que os laboratórios de virologia têm, em geral, melhores condições de realizar esta técnica do que os laboratórios de bacteriologia.

Desde a colheita do material clínico com "swab" de alumínio com ponta de algodão, até a inoculação em monocamadas de células McCoy tratados com 5-iodo 2-deoxiuridina, cuidados devem ser tomados para que o material colhido e passado para o meio de transporte (meio mínimo de Eagle modificado, com soro fetal bovino 5-10%, gentamicina 20 $\mu$ g/ml, vancomicina 10 $\mu$ g/ml e fungizona 2,5 $\mu$ g/ml) seja acondicionado em gelo e que não ultrapassem 12 horas entre a colheita e a inoculação. Para armazenar as amostras, na impossibilidade de inoculá-las imediatamente, é necessário mantê-las congeladas a -70°C.

Depois de inoculadas com o material clínico, as monocamadas são centrifugadas por 1 hora a 2.000+g, a temperatura ambiente.

Após a incubação a 37°C por 48 horas, as monocamadas são fixadas pelo metanol por 10 minutos e podem ser coradas pelo Giemsa, iodo ou por corantes imunofluorescentes (conjugados), para a pesquisa das inclusões que correspondem a colônias intracitoplasmáticas de *C. trachomatis*.

Os preparados corados pelo Giemsa, quando examinados em microscópio de campo escuro permitem identificar as inclusões como estruturas alaranjadas ou amarelas brilhantes num fundo azulado.

Pela coloração com o iodo (Lugol), as inclusões contendo glicogênio se coram de castanho escuro, contra um fundo amarelo, sendo examinadas em microscópio comum de campo claro.

Na técnica de imunofluorescência indireta os preparados são incubados em câmara úmida com um soro anti-clamídia, por 30 minutos a 37°C, depois lavados com PBS, incubados (30 min/37°C) com um conjugado anti-imunoglobulinas espécie-específico, diluído em azul de Evans; após serem lavados novamente com o PBS, os preparados são montados com glicerina tamponada (pH 9,6) e examinados em microscópio de fluorescência. As inclusões aparecerão como massas justanucleares fluorescentes, amarelo-esverdeadas, contra um fundo escuro ou avermelhado.

## Sorologia

Os testes sorológicos para o diagnóstico das infecções por clamídia têm valor limitado. Os anticorpos séricos persistem por longos períodos e a detecção de anticorpos numa única amostra de soro de um paciente pode indicar apenas exposição prévia ao microorganismo. Soros pareados são difíceis de se obter, porque as infecções podem ser, freqüentemente, assintomáticas ou ter um longo período de incubação. Populações de alto risco têm altos índices de cicatriz sorológica e nas clínicas de DST são detectados anticorpos em cerca de 25% dos homens e 60-70% das mulheres, dos quais não havia sido isolada a clamídia(2).

O teste sorológico mais utilizado é a imunofluorescência indireta. Este teste tem maior valor para estudos soroepidemiológicos.

## Exames diretos do material clínico

O exame direto de raspados de conjuntiva para a identificação das inclusões de clamídia é um método tão sensível quanto o isolamento, para o diagnóstico das infecções oculares no recém-nascido.

O exame direto do material genital para o diagnóstico das infecções por clamídia tem valor limitado(2).

Para o exame direto é preparada uma lâmina do material clínico que pode ser corada e examinada microscopicamente para a pesquisa das inclusões. As colorações mais amplamente usadas são a de Giemsa e a imunofluorescência. Entretanto, estas técnicas variam em sensibilidade e aplicabilidade, devendo ser utilizadas com extremo cuidado.

O exame citopatológico de esfregaços ecto e endocervicais corados pelo método de Papanicolaou tem sido utilizado para o diagnóstico das cervicites por *C. trachomatis*. A técnica é pouco sensível, devendo ser usada apenas como um método de diagnóstico presuntivo para confirmação por outras técnicas mais sensíveis, tais como a imunofluorescência direta, usando anticorpos monoclonais, a técnica de imunoperoxidase(4) ou o isolamento em cultura celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, M.W. ABC of sexually transmitted diseases: pregnancy and the neonate: *Br. Med. J.*, **288** (6417): p. 624-627, 25 Feb., 1984.
2. BIRD, B.R. & FORRESTER, F.T. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. U.S. Dep of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, CDC Bureau of Laboratories, Atlanta, 1980.
3. HARE, M.J. & THIN, R.N. Chlamydial infections of the lower genital tract of women. *Br. Med. Bull.* **39** (2): p. 138-144, 1983.
4. KIVIAT, N.B. et alii. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. II-Confirmation of *Chlamydia trachomatis* infection by direct immunofluorescent using monoclonal antibody. *Jama*, **253** (7): p. 997-1000, 1985.
5. MARDH, P.A. Bacteria, chlamydia and mycoplasmas. In: HOLMES, K.K. et alii. *Sexually transmitted diseases*. New York, McGraw-Hill 1984. Cap 69, p. 829-56.
6. ORIEL, J.D. & RIDGWAY, G.L. Genital infection in men. *Br. Med. Bull.*, **39** (2) p. 133-137, 1983.
7. SCHACHTER, J. Biology of *Chlamydia trachomatis*. In: HOLMES, K.K. et alii. *Sexually transmitted diseases*. New York, Mc Graw-Hill, 1984. Cap.23, p. 243-57.

A reedição deste manual contou com a colaboração da Organização Pan-Americana de Saúde, Organização Mundial de Saúde, através do Projeto AM/BRA/CDS-010/VD/88/89 e do CNPq.

**É proibido o uso para fins comerciais**

Brasília - 1992

