

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA

CLAMÍDIA



Ministério da Saúde
Programa Nacional de DST/AIDS

Ministério da Saúde

Carlos César Silva Albuquerque

Ministro de Estado da Saúde

Antônio Joaquim Werneck

Secretário de Assistência à Saúde

Pedro José Novais Chequer

Coordenador Geral do Programa Nacional de DST/AIDS-MS

Miriam Franchini

Coordenadora Geral do projeto TELELAB

Autores:

Cláudia Renata Fernandes Martins
Geni Neumann Nocetti de Lima Câmara
José Antônio Pinto de Sá Ferreira
Luiz Alberto Peregrino Ferreira
Luiz Fernando de Goes Siqueira
Maria Luíza Bazzo
Miriam Franchini
Oscar Jorge Berro
Sílvio Valle

Assessoria Pedagógica:

Maria Lúcia Ricciotti Ribinik
Maristela Arantes Marteleto

Diagnóstico laboratorial da Clamídiid. - Brasília:
Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças
Sexualmente Transmissíveis e AIDS. 1997.
63p. : il. (Série TELELAB)

1. Clamídia I. Programa Nacional de Doenças
Sexualmente Transmissíveis e AIDS (Brasil). II. Série
TELELAB.

Os responsáveis pela implantação do TELELAB empenharam toda sua capacidade profissional para tornar este projeto digno da qualidade técnica e científica e da eficiência que nossa coordenadora geral sempre imprimiu às realizações do Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde.

À **Dr^a. Lair Guerra de Macedo Rodrigues**, exemplo de coragem e liderança, dedicamos este trabalho.

Pedro Chequer



APRESENTAÇÃO	04
INTRODUÇÃO e CONCEITOS BÁSICOS	09
antígeno e anticorpo	09
anticorpos monoclonais, conjugado monoclonal, linhagem de células McCoy	10
fase sólida	11
tipos de sistema de detecção	12
sensibilidade e especificidade	13
reprodutibilidade	13
FUNDAMENTOS E METODOLOGIAS	17
as clamídias e seu ciclo biológico	18
metodologias disponíveis para o diagnóstico laboratorial	20
isolamento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	22
metodologias recomendadas pelo PN-DST/AIDS	24
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	27
funcionamento da IFD	27
material necessário para IFD	28
execução da IFD	29
leitura e interpretação da IFD	30
ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS - TRIAGEM E CONFIRMATÓRIOS	35
funcionamento do ELISA	35
material necessário para ELISA	40
execução do ELISA	41
leitura e interpretação dos resultados	42
diagnóstico confirmatório	43
sorologia, Papanicolau e diagnóstico da infecção por clamídia	44
método de controle após o tratamento da infecção	45
CONTROLE DE QUALIDADE	49
preparo de lâminas de controle	49
importância do protocolo e controle de qualidade internos	50
programa de avaliação externa da qualidade	51
FÓRMULAS	55
ANEXOS	59
BIOSSEGURANÇA	I - XIV
CONSIDERAÇÕES FINAIS	a - g
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	



Agora você faz parte do sistema de educação a distância para profissionais da saúde, envolvidos com o diagnóstico laboratorial das Doenças Sexualmente Transmissíveis - DST/AIDS - TELELAB.

O TELELAB foi criado para levar até você cursos com informações indispensáveis para que seu trabalho seja realizado dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS do Ministério da Saúde PN-DST/AIDS - MS.

Assistindo ao programa de vídeo e estudando este manual, você terá a oportunidade de verificar o que pode ser mudado no seu dia-a-dia e o que pode ser mantido.

Assim, você terá mais confiança nos resultados do seu trabalho e mais tranquilidade no que se refere à sua segurança pessoal.

GUARDE ESTE MANUAL PARA CONSULTAR SEMPRE QUE NECESSÁRIO. ELE É SEU. USE-O!

Para esclarecimento de dúvidas e sempre que precisar, comunique-se diretamente com:

TELELAB - PN-DST/AIDS - MS

Telefax gratuito: 0800 - 61 - 2436



Funcionamento do seu curso TELELAB

Inscrição
Pré-teste



Vídeo e
Manual



Pós-teste e
Questionário
de Avaliação



Certificado

Agora que você já fez a inscrição e o pré-teste, está na hora de se organizar para fazer seu curso! Você tem um mês para concluí-lo.

Assista ao vídeo quantas vezes você precisar. No manual, estão todos os conteúdos para o seu estudo.

Faça o pós-teste e responda ao questionário de avaliação. Suas informações são fundamentais para a melhoria do TELELAB.

Para obter o certificado, você deverá acertar no mínimo 80% do teste. Depois da correção do seu teste pelo PN-DST/AIDS, você receberá o certificado.



Ao final deste curso você será capaz de:

- # identificar os procedimentos e técnicas recomendados pelo Programa Nacional de DST/AIDS, do Ministério da Saúde, para o diagnóstico laboratorial da clamídia;
- e # executar o diagnóstico laboratorial da clamídia obedecendo aos critérios técnicos, critérios de controle de qualidade e cuidados de biossegurança recomendados.

CLAMÍDIA

INTRODUÇÃO E
CONCEITOS BÁSICOS





Introdução

Embora o tracoma, doença ocular causada pela *Chlamydia trachomatis*, fosse conhecido desde 1500a.C., as primeiras suspeitas de que pudessem ocorrer infecções por clamídia no trato genital feminino datam de 1910. Em 1907, haviam sido descritas por Halberstaedter e Von Prowazek inclusões citoplasmáticas em células raspadas da conjuntiva de pacientes com tracoma. Em 1933, Findlay relacionou a clamídia ao linfogranuloma venéreo e, em 1957, foi relatado o primeiro isolamento de *Chlamydia trachomatis* em material inoculado em ovos embrionados de galinha. Foi somente a partir de 1965 que o isolamento da clamídia passou a ser mais utilizado, com a padronização do método de isolamento em cultura celular por Gordon e Quan. Esse método substituiu as técnicas de isolamento em animais de laboratório e em ovos embrionados de galinha.

Conceitos básicos

Antígeno - Ag

Antígeno é qualquer agente que induz no organismo a produção dos anticorpos e ao qual esses anticorpos podem se ligar especificamente.

Anticorpo - Ac

Anticorpo é uma proteína produzida pelo sistema imune em resposta a um ou mais antígenos. O anticorpo pode se ligar de maneira específica ao antígeno. É essa ligação entre antígeno e anticorpo que constitui a base dos testes imunológicos.



Anticorpos monoclonais

São anticorpos produzidos por hibridomas. Hibridomas são clones de células originadas da fusão entre uma célula plasmática normal, produtora de anticorpos e uma célula de mieloma. Por exemplo, a partir de um antígeno purificado da principal proteína da membrana mais externa (MOMP) da *Chlamydia trachomatis*, pode-se produzir Acs em células plasmáticas e depois fundir essas células com células de mieloma. As células híbridas resultantes produzirão anticorpos específicos contra a MOMP, indefinidamente.

Conjugado monoclonal

É um conjugado obtido pela união de um anticorpo monoclonal com uma molécula de substância fluorescente ou com uma enzima.

Linhagem de células McCoy

Chama-se cultura celular à cultura *in vitro* de células de um tecido. Quando essas células são cultivadas sucessivamente, temos uma linhagem celular. A linhagem de células McCoy é originada de fibroblastos de um tumor de camundongo. Essa linhagem forma uma única camada de células, monocamada, na superfície plana de um frasco para cultura celular. As figuras a seguir mostram um frasco de cultura celular e uma monocamada de células McCoy, observada em microscopia de contraste-de-fase.

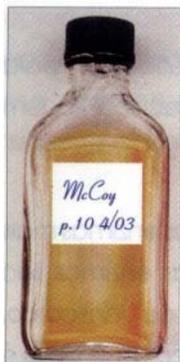


Figura 1: frasco de cultura celular

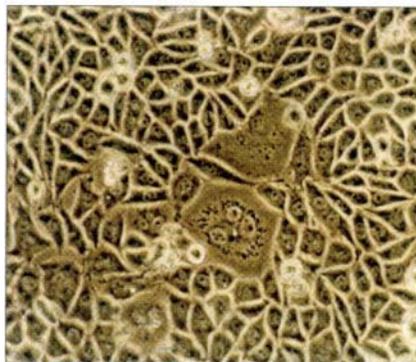


Figura 2: visão microscópica em contraste de fase de uma monocamada de células McCoy

Fase sólida

Fase sólida é qualquer material no qual se fixa o antígeno ou o anticorpo para realização de testes imunológicos. No diagnóstico das infecções por *Chlamydia trachomatis*, as fases sólidas podem ser:

placas de microtitulação - são o suporte sólido mais comumente utilizado. Normalmente, são produzidas com poliestireno transparente. Os poços ou cavidades podem possuir fundo chato, arredondado ou em "U". Sua apresentação geralmente corresponde a 96 cavidades em uma peça única ou em tiras de 8 ou 12 poços; e

pérolas - esferas plásticas em cuja superfície os antígenos e anticorpos podem ser adsorvidos. São freqüentemente utilizadas esferas com 4 ou 6 mm de diâmetro.



Tipos de sistema de detecção

Sistema de detecção é um conjunto de procedimentos utilizados para determinar se o antígeno e o anticorpo ligaram-se de maneira específica. Podem ser de vários tipos, tais como:

imunoenzimático (ELISA) - A fosfatase alcalina e a peroxidase são as enzimas mais utilizadas para detectar as ligações antígeno e anticorpo. Essas enzimas são conjugadas ou covalentemente ligadas a um antígeno ou anticorpo, constituindo o conjugado imunoenzimático. O substrato específico da enzima é adicionado e degradado pela ação da enzima. O produto da degradação do substrato vai agir no cromógeno adicionado à reação. A ortofenileno-diamina (OPD) ou a 3,3',5,5' - tetrametil-benzidina (TMB) são os cromógenos mais rotineiros.

O resultado da reação pode ser lido em espectrofotômetro com filtros de comprimento de onda variando de 405 a 492 nm ou ainda visualmente, quando o teste assim o permitir, ou for expressamente indicado pelo fabricante. Dependendo do cromógeno utilizado, a cor observada pode ser amarela, azul ou verde-azulada; e

imunofluorescência - o detector é um composto químico fluorescente, conjugado com uma anti-imunoglobulina. A substância fluorescente mais comumente usada é o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para a leitura da reação, esse ensaio requer um microscópio para imunofluorescência.



Reprodutibilidade

Reprodutibilidade de um teste é a capacidade de se obter repetidamente, com uma mesma metodologia, resultados semelhantes frente às mesmas amostras, mesmo quando estas forem testadas em ordem ou momentos distintos.

Sensibilidade e Especificidade

Nenhum teste de diagnóstico é 100% eficaz. Alguns erros podem ser decorrentes de questões relativas aos próprios testes. Dentre vários parâmetros para descrever a qualidade dos testes, a sensibilidade e a especificidade são as mais conhecidas.

Sensibilidade de um teste é a capacidade que esse teste tem de detectar a presença de antígeno ou de anticorpo em uma amostra verdadeiramente positiva.

Especificidade de um teste é a capacidade do teste de identificar amostras verdadeiramente negativas.

Os resultados de sensibilidade e especificidade geralmente são expressos em valores percentuais e são calculados por meio das fórmulas apresentadas a seguir.



AP-amostras positivas
 AN-amostras negativas
 FP-amostras falso-positivas
 FN-amostras falso-negativas

$$\text{Sensibilidade} = \frac{AP}{AP+FN} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{AN}{AN + FP} \times 100$$

Veja um exemplo de aplicação dessa fórmula.

Duzentas amostras de secreção uretral foram examinadas por uma metodologia padrão. Dessas, 50 eram positivas e 150 negativas. Quando submetidas a um determinado teste, esse apresentou os seguintes resultados: detectou 48 amostras positivas, ou seja, apresentou resultado falso-negativo com 2 amostras; confirmou as 150 amostras negativas, sem nenhum resultado falso-positivo.

AP = 48

AN = 150

FP = ZERO

FN = 2

$$\text{Sensibilidade} = \frac{48}{48 + 2} \times 100$$



Sensibilidade = 96%

$$\text{Especificidade} = \frac{150}{150 + 0} \times 100$$



Especificidade = 100%

CLAMÍDIA

FUNDAMENTOS E
METODOLOGIAS



O que são clamídias?

As clamídias são bactérias gram-negativas, parasitas obrigatórios de células eucarióticas. As clamídias dependem do aparato energético da célula hospedeira, porque não possuem um sistema de produção de energia para o desenvolvimento do seu ciclo biológico.

Devido às características peculiares da sua biologia, são classificadas em uma ordem própria, uma família, um único gênero e três espécies. Veja:

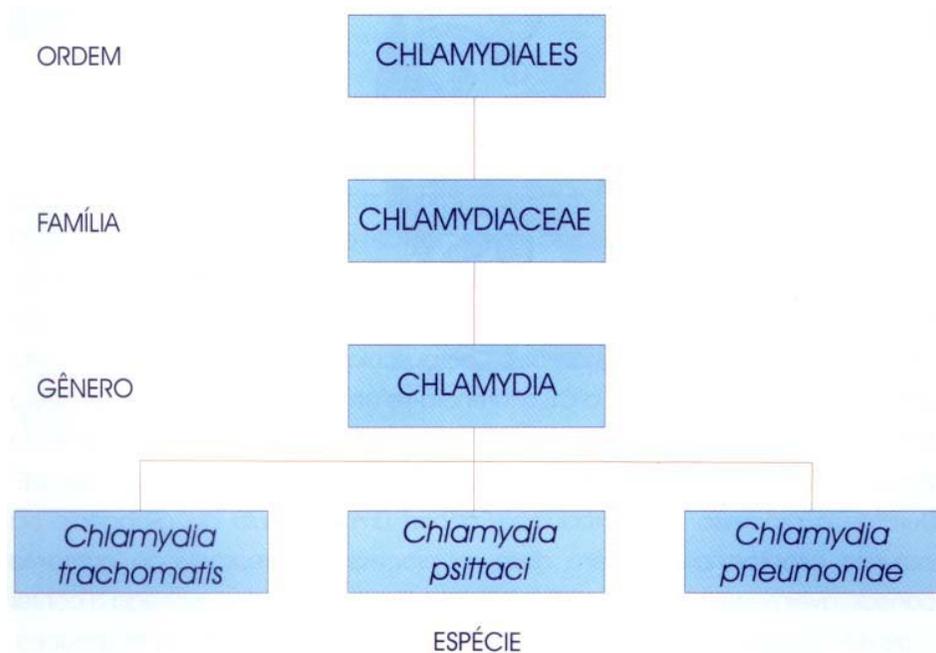


Figura 1: classificação das clamídias



A espécie *Chlamydia trachomatis* possui quinze sorotipos, descritos de acordo com seus determinantes antigênicos que podem ser relacionados a várias doenças. Veja o quadro a seguir:

Principais doenças associadas aos sorotipos da *Chlamydia trachomatis*:

Sorotipos	Principais doenças associadas
A, B, Ba, C	Tracoma
L1, L2, L3	Linfogranuloma venéreo (LGV)
D, E, F, G, H, I, J e K	Uretrite não gonocócica (UNG), uretrite pós-gonocócica (UPG), cervicite, doença inflamatória pélvica (DIP), endometrite, paratracoma, conjuntivite de inclusão, pneumonia do recém-nascido.

Como é o ciclo biológico da *Chlamydia trachomatis*?

O ciclo biológico da *Chlamydia trachomatis* envolve a participação de duas formas distintas: o corpúsculo elementar (CE) e o corpúsculo reticular (CR). O CE com 300 a 400 nm de diâmetro é a forma infectante e que resiste ao meio extracelular. O CE penetra na célula por fagocitose, formando um vacúolo citoplasmático também chamado corpúsculo de inclusão ou inclusão citoplasmática. Em seguida, o CE diferencia-se em CR, com diâmetro de 800 a 1000 nm. O CR é a forma replicativa, metabolicamente ativa e não infectante da bactéria. Os CR reproduzem-se por divisão binária e reorganizam-se em CE. Durante o processo de reprodução, ocorre um acúmulo de glicogênio na inclusão citoplasmática. Além disso, o processo de reprodução aumenta consideravelmente o tamanho da inclusão citoplasmática, que chega a conter mais de 10.000 partículas, ocupando até 3/4 do volume da célula hospedeira. Isso causa o rompimento do vacúolo e da célula, a liberação das partículas e, conseqüentemente, o reinício do ciclo biológico, com a manutenção do processo infeccioso.

Acompanhe, no esquema a seguir, o ciclo biológico da *Chlamydia trachomatis*, observando a seqüência de 1 a 6 indicada.

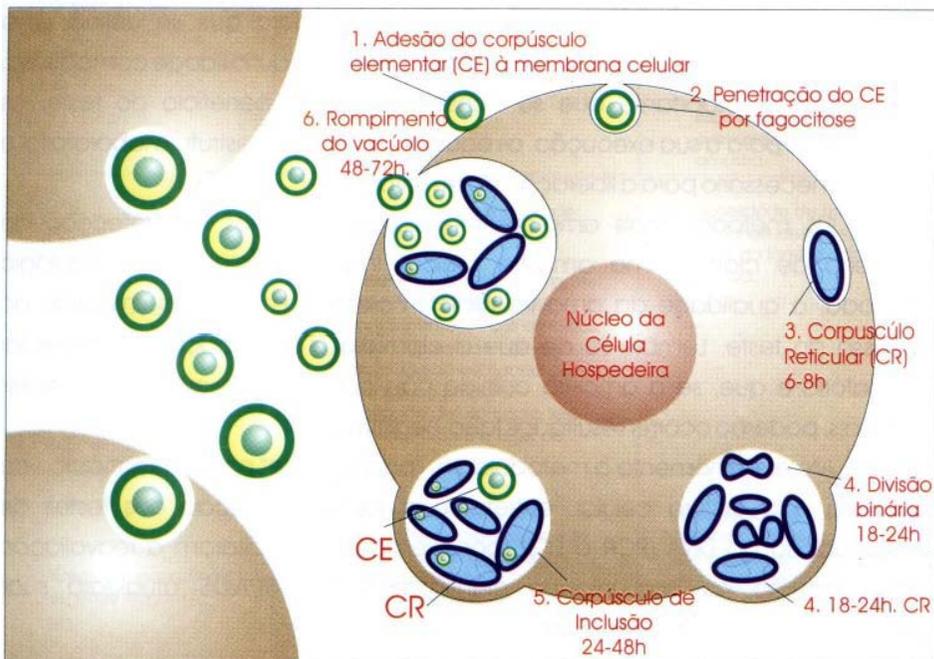


Figura 2: esquema representativo do ciclo biológico da clamídia

Lembre-se

O CE é a forma infectante que resiste ao meio extracelular e o CR é a forma replicativa, não infectante e intracelular.



*Quais as metodologias disponíveis para o diagnóstico laboratorial da *Chlamydia trachomatis*?*

Existem diversas metodologias que podem ser utilizadas. A escolha de um determinado método deve levar em consideração a prevalência da infecção na população que vai ser examinada, para que se defina uma metodologia com sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade compatíveis. Além disso, é importante que se considere o custo-benefício do teste, as dificuldades para a sua execução, os equipamentos, infra-estrutura laboratorial e o tempo necessário para a liberação dos resultados.

Os métodos mais amplamente utilizados são os de detecção do antígeno de clamídia na amostra clínica. Independente da metodologia adotada, a qualidade da amostra clínica coletada é fator determinante do sucesso do teste. Lembre-se de que a clamídia é uma bactéria intracelular obrigatória e que, se a amostra colhida não contiver pelo menos 50 células epiteliais, poderão ocorrer resultados falso-negativos.

Até esse momento a metodologia "padrão-ouro" para o diagnóstico da clamídia é a cultura celular, entretanto a rápida evolução dos testes de amplificação do DNA (PCR e LCR, por exemplo) já suscitaram a reavaliação desse padrão na comunidade científica. O PN-DST/AIDS atualizará suas orientações sempre que necessário.

Veja, na próxima página, o quadro que relaciona as metodologias disponíveis, suas vantagens e limitações:

METODOLOGIA	VANTAGENS	LIMITAÇÕES
Isolamento em cultura celular	<p>Especificidade elevada (98% ou mais).</p> <p>Estocagem de cepas para controle de resistência a antibióticos e concentração inibitória mínima.</p> <p>Visualização das inclusões de clamídia dentro das células.</p>	<p>Sensibilidade variável (70 a 95%).</p> <p>Necessidade de infraestrutura laboratorial compatível.</p> <p>Dificuldade em avaliar a qualidade da amostra.</p> <p>Necessidade de cuidados especiais para transporte e acondicionamento da amostra.</p>
Imunofluorescência direta (IFD)	<p>Sensibilidade e especificidade acima de 95%.</p> <p>Infra-estrutura laboratorial simples. Facilidade no transporte e acondicionamento das amostras. Execução rápida da coloração. Possibilidade de avaliação da qualidade da amostra. Possibilidade de uso como teste confirmatório para o ELISA de triagem.</p>	<p>Necessidade de microscópio de imunofluorescência. Leitura da lâmina difícil e subjetiva.</p>
Ensaio imunoenzimático ELISA de triagem	<p>Sensibilidade de 85 a 95%. Possibilidade de processamento simultâneo de um grande número de amostras. Facilidade no transporte e acondicionamento da amostra. Objetividade na leitura dos resultados.</p>	<p>Especificidade de 80 a 95%. Impossibilidade de controle de qualidade da amostra. Necessidade absoluta de teste confirmatório.</p>
Testes rápidos	<p>Testes realizados em menos de 30 minutos. Leitura feita a olho nu. Possibilidade de execução em consultórios e ambulatórios.</p>	<p>Baixa especificidade (entre 65 a 85%). Necessidade absoluta de testes confirmatórios.</p>
PCR e LCR	<p>Sensibilidade e especificidade elevadas (acima de 95%).</p>	<p>Necessidade de pessoal qualificado. Custo elevado.</p>

Como é feito o isolamento da *Chlamydia trachomatis*?

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 em cultura celular, considerado "padrão-ouro", é método sensível e específico para o diagnóstico das infecções por *Chlamydia trachomatis*, exigindo, entretanto, 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.

A linhagem de células McCoy, é a mais utilizada para a cultura de *Chlamydia trachomatis*. As células são mantidas em garrafas de plástico estéreis, através de repiques periódicos. Para o isolamento da clamídia as células são cultivadas sobre lamínulas circulares em tubos de centrífuga de fundo chato. Observe nas figuras 3 e 4.

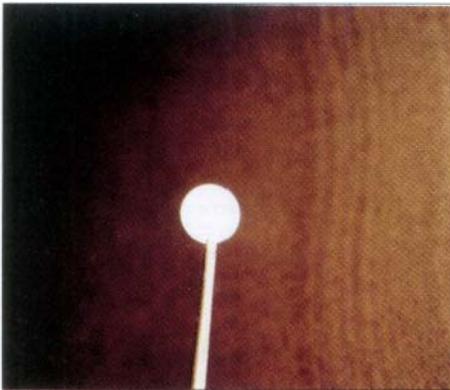


Figura 3

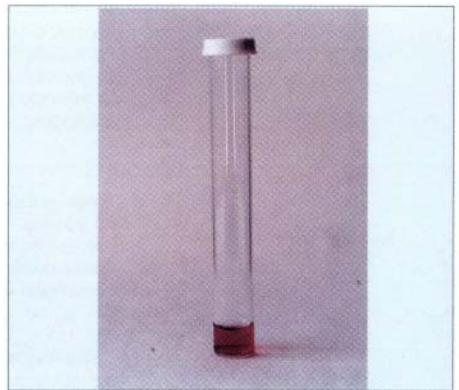


Figura 4

A amostra deve ser mantida sob refrigeração entre 4 e 8°C e o intervalo de tempo entre a coleta e a inoculação não pode ultrapassar 24 horas. O transporte ao laboratório deve ser feito em caixa térmica com gelo. As amostras não inoculadas no prazo de 24 horas devem ser estocadas a -70°C até serem processadas.

O preparo da amostra para a inoculação começa logo após a coleta. O swab é lavado vigorosamente em meio de transporte 2SP (sacarose 0,2M; fosfato 0,02M; soro fetal bovino 10%; gentamicina, 10µg/ml; vancomicina, 10µg/ml e fungizona, 2,5µg/ml).

A inoculação é feita substituindo-se o meio de crescimento celular no tubo de fundo chato pelo meio de transporte contendo a amostra. Em seguida, o tubo é centrifugado a 2000g por 1 hora a 35°C, para que os corpúsculos elementares eventualmente presentes nas amostras possam aderir-se à membrana celular e então penetrar na célula.

Os tubos são incubados a 37°C e após 48 horas as monocamadas são fixadas com metanol por 10 minutos. A lamínula circular é corada com lugol ou com conjugado fluorescente.

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

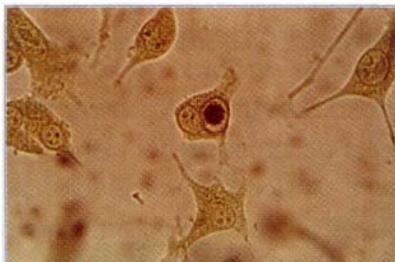


Figura 4: inclusão de clamídia corada pelo lugol em microscópio de campo claro

Na coloração de imunofluorescência podem ser usados conjugados de fluoresceína com anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis para esse fim. As lâminas circulares coradas são examinadas ao microscópio de fluorescência. Os corpúsculos de inclusão aparecerão, rechaçando o núcleo, como massas citoplasmáticas fluorescentes, verde-brilhantes, contra um fundo escuro ou avermelhado. Observe a figura 5.

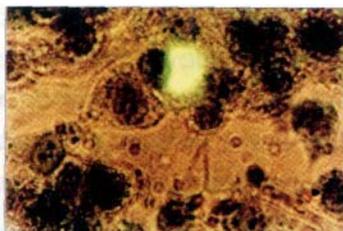


Figura 5: inclusão de clamídia corada por imunofluorescência

*Quais as metodologias recomendadas pelo PNDST-AIDS para o diagnóstico laboratorial da *Chlamydia trachomatis*?*

Como regra geral, o Ministério da Saúde, através do PN-DST/AIDS sugere um ensaio imunoenzimático ELISA indireto para teste de triagem e uma variação do mesmo como teste confirmatório. Além dos testes do tipo ELISA, também a imunofluorescência direta é sugerida como padrão de trabalho.

A escolha de um desses métodos deve ser avaliada levando em consideração a prevalência da infecção por clamídia na população que será examinada. Além disso, é importante considerar o custo-benefício e as dificuldades para a execução do teste; os equipamentos e a infra-estrutura laboratorial necessários e o tempo para a liberação dos resultados.

CLAMÍDIA

IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA



Como funciona o teste de imunofluorescência direta para clamídia?

O teste de imunofluorescência direta corresponde a uma reação específica entre um antígeno MOMP da clamídia e um anticorpo monoclonal específico contra esse antígeno, conjugado a uma fluoresceína (isotiocianato de fluoresceína - FITC). Veja, a seguir, a representação esquemática das reações positiva e negativa do teste IFD.

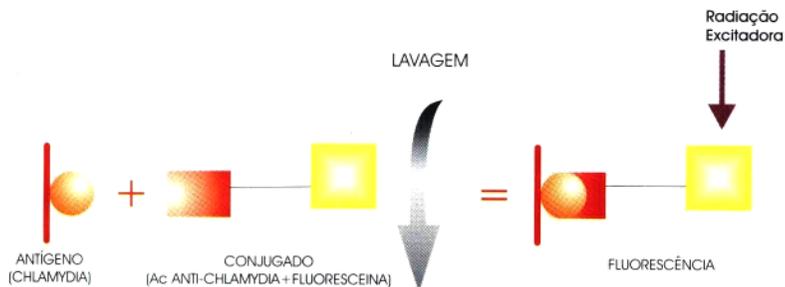


Figura 1: reação positiva de IFD

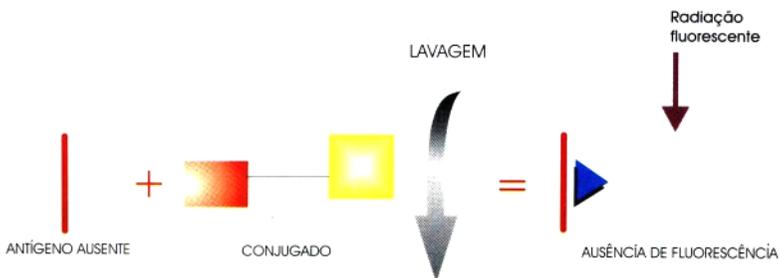


Figura 2: reação negativa de IFD



Qual o material necessário para executar uma reação de IFD para clamídia?

- /// Conjunto diagnóstico para IFD para detecção de clamídia;
- /// lâminas-controle;
- /// pipeta de vidro para volumes de 1 a 5 ml;
- /// pipeta automática para volumes de 10 a 50 μ l;
- /// ponteiros descartáveis para pipeta automática;
- /// papel absorvente;
- /// câmara úmida;
- /// cuba para lavagem de lâmina tipo Koplín;
- /// lamínula de vidro 22 x 40 mm ou 24 x 50 mm; e
- /// microscópio de fluorescência com sistema de filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com capacidade de aumento de 400-500X e 1000X.

Como fazer o teste de IFD?

O teste de IFD para diagnóstico da clamídia deve ser realizado de acordo com as instruções do fabricante do conjunto diagnóstico utilizado.

Mas, para executar corretamente esse teste e assegurar a qualidade dos resultados, você deve observar alguns procedimentos básicos:

1. leia as instruções do conjunto diagnóstico;
2. separe todo o material necessário para a execução do teste;
3. siga rigorosamente as instruções do fabricante para o preparo de tampões e outros reagentes;
4. deixe as lâminas das amostras e as lâminas de controle atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a coloração. O conjugado e a solução para a lavagem das lâminas também devem estar em temperatura ambiente;
5. organize seu protocolo;
6. siga rigorosamente as instruções do fabricante quanto aos volumes pipetados, tempos de incubação, temperatura, número de lavagens e montagem;
7. faça, obrigatoriamente, a coloração das lâminas de controle em paralelo com as lâminas das amostras; e
8. utilize as lâminas de controle como referência para a leitura das lâminas em teste.

Veja no título Controle de Qualidade deste manual como preparar as lâminas de controle para IFD da clamídia.

A temperatura ambiente em laboratórios clínicos deve estar entre 20 e 26°C.



Como fazer a leitura e a interpretação da IFD?

A leitura das lâminas é feita em microscópio de fluorescência com aumento de 40 X ou 100 X (imersão).

Inicie a leitura pelas lâminas-controle, observando atentamente o padrão de cor e tamanho dos corpúsculos elementares.

O ponte de corte (cut off) da reação varia de um fabricante para outro. Geralmente, para se confirmar um resultado positivo, é preciso encontrar 5 ou mais corpúsculos elementares por esfregaço. Este critério pode ser ajustado segundo sua experiência na prática profissional.

O quadro a seguir apresenta os critérios para leitura e interpretação dos resultados.

LEITURA	INTERPRETAÇÃO
Ausência de corpúsculos fluorescentes em esfregaço com mais de 50 células epiteliais.	Amostra não reagente
Presença de pelo menos 5 corpúsculos elementares de cor verde-brilhante em tom de maçã verde com a forma de círculos perfeitos.	Amostra reagente
Qualquer padrão diferente dos descritos anteriormente ou quando houver menos de 50 células epiteliais no esfregaço.	Amostra indeterminada



Em função da sensibilidade e especificidade acima de 95% do teste de IFD, não é necessária a realização de um outro teste confirmatório.

A leitura das lâminas da imunofluorescência exige experiência e atenção. É aconselhável a leitura de até 4 lâminas por hora, com intervalo entre as leituras.

Por isso, se seu laboratório trabalha com um pequeno número de amostras, você pode escolher a IFD como padrão de trabalho.

Caso contrário, utilize um ELISA de triagem, submetendo as amostras reagentes e indeterminadas a um teste confirmatório.

CLAMÍDIA

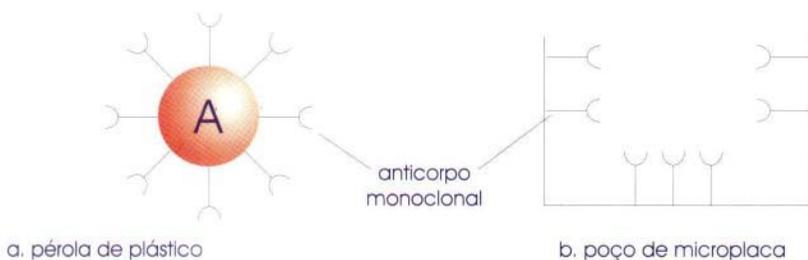
ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS
TRIAGEM E CONFIRMATÓRIOS



Como funciona o ELISA para a detecção de antígeno de clamídia?

O ELISA para a detecção de clamídia diretamente de amostras clínicas é um ELISA indireto.

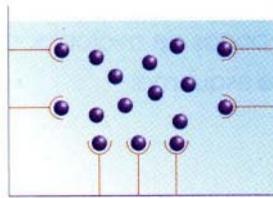
1. Esse teste usa anticorpo monoclonal anticlamídia, recobrimo pérolas plásticas (a), ou a superfície interna de poços de microplacas (b), e que corresponde à fase sólida da reação. Veja esse esquema:



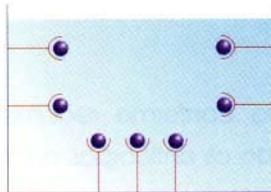
2. A amostra clínica, tratada conforme recomendação do fabricante, é adicionada ao poço, contendo os anticorpos aderidos, por exemplo, quando trabalhamos com microplacas:



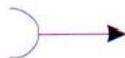
3. Os antígenos de clamídia presentes na amostra ligam-se aos anticorpos específicos da fase sólida, mediante a incubação em temperatura adequada e tempo determinado, segundo a procedência do teste. Observe o esquema a seguir:



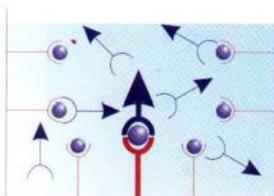
4. A lavagem dos poços da microplaca vão retirar todo o antígeno que não se ligou especificamente ao anticorpo monoclonal. Repare:



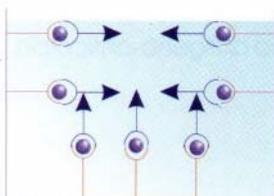
A etapa seguinte utiliza um anticorpo IgG anticlamídia produzido em coelho, que representamos assim:



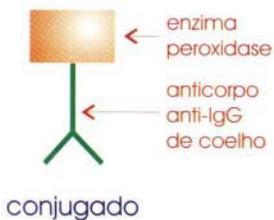
5. Esse anticorpo vai ligar-se durante a incubação ao conjunto do antígeno e anticorpo de fase sólida, representado já no item 4.



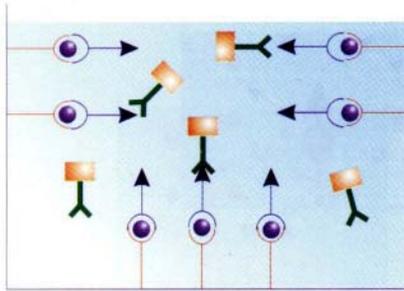
6. Outra etapa de lavagem vai retirar o que não se ligou ao complexo antígeno-anticorpo da fase sólida:



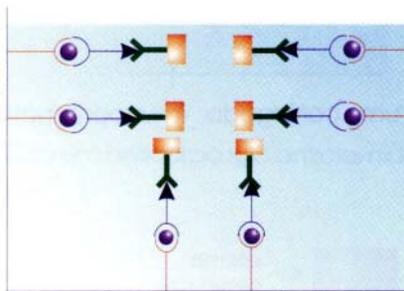
A próxima etapa utiliza um conjugado imunoenzimático que pode ser esquematizado assim:



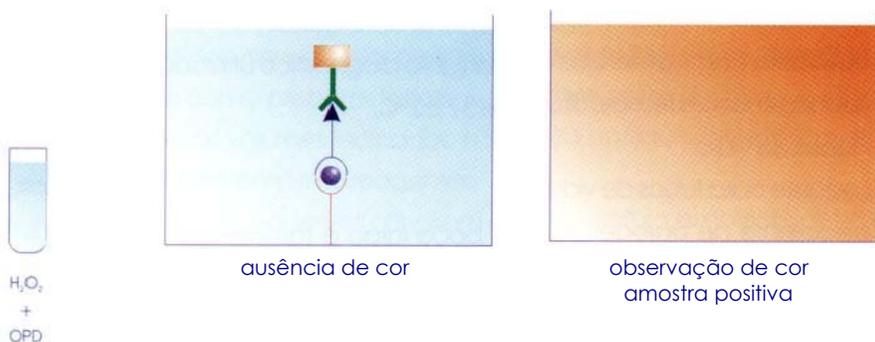
7. A última etapa de incubação corresponde ao esquema abaixo:



8. Essa última etapa de lavagem é muito importante para que não fique conjugado não ligado ao complexo antígeno-anticorpo.



9. Por último, é adicionado o substrato da enzima, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de um revelador, que pode ser o OPD (orto-fenilenodiamina) ou o TMB. A presença de cor indica que havia antígeno de clamídia na amostra.



Observe que essa metodologia é para triagem. Para que se considere um resultado positivo, é necessário o uso de um segundo teste confirmatório.

A vantagem do ELISA é que podemos processar numerosas amostras ao mesmo tempo e é possível a interpretação objetiva do resultado por intermédio da leitura pelo espectrofotômetro.



Qual o material necessário para executar uma reação de ELISA para clamídia?

- /// conjunto diagnóstico de ELISA para clamídia, para triagem ou confirmação;
- /// pipeta de vidro de 1 e 5 ml;
- /// pipetas automáticas monocanal de 200-300 μ l, ou outros volumes especificados pelo fabricante;
- /// pipetas automáticas multicanal, quando exigidas pelo conjunto diagnóstico;
- /// lavadora compatível com o conjunto diagnóstico utilizado;
- /// banho-maria a temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$;
- /// tubos de vidro;
- /// estante para tubos de vidro;
- /// recipiente de paredes rígidas, boca larga e tampa, contendo hipoclorito de sódio a 2%;
- /// agitador de tubos tipo vórtex; e
- /// espectrofotômetro com filtro compatível com o conjunto diagnóstico utilizado.

Quais os procedimentos para executar os ELISA?

Os procedimentos variam segundo o fabricante do conjunto de diagnóstico. Alguns procedimentos gerais devem ser observados:

1. leia todas as instruções do conjunto, antes de iniciar a reação;
2. confira os componentes, materiais e reagentes desse conjunto e verifique que outros, não fornecidos, devem estar disponíveis para a realização dos testes;
3. leia atentamente como preparar todas as soluções antes de iniciar o ensaio. Utilize exatamente os volumes indicados, não faça qualquer alteração com o intuito de economizar tempo ou reagentes;
4. deixe as amostras e os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de iniciar a reação;
5. organize seu protocolo;
6. siga rigorosamente os ciclos de lavagem indicados pelo fabricante, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das amostras;
7. inclua, além dos controles fornecidos pelo fabricante, controles positivos e negativos produzidos em seu laboratório (Controle de Qualidade Interno - CQI); e
8. faça a leitura da absorbância em espectrofotômetro com filtro recomendado pelo fabricante.

Jamais extraia o antígeno da amostra clínica com agitação manual. Sempre agite os controles e as amostras por agitação mecânica vigorosa.



Além disso, para garantir a qualidade dos resultados é importante que você:

- /// não use reagentes com prazo de validade vencido. Verifique se os reagentes encontram-se dentro das especificações, sem turvação, precipitados ou com coloração alterada;
- /// não misture controles, conjugados, pérolas ou placas de diferentes lotes e/ou fabricantes;
- /// armazene os conjuntos para diagnóstico de acordo com as recomendações do fabricante;
- /// evite a contaminação microbiana dos reagentes;
- /// não exponha o substrato à luz durante a estocagem ou incubação, pois poderá ocorrer a fotodecomposição do mesmo;
- /// não coloque o substrato em contato com substâncias oxidantes ou metais para evitar a precipitação que torna o produto impróprio para o uso;
- /// faça a limpeza e a manutenção periódica dos equipamentos de lavagem, evitando assim o acúmulo de sais e outros compostos químicos;
- /// verifique sempre se o filtro usado para a leitura da absorbância é aquele indicado pelo fabricante; e
- /// certifique-se de que o filtro de leitura da absorbância esteja íntegro, livre de fungos e de sujidades e devidamente ajustado.

Como definir se um resultado de ELISA é reagente ou não reagente?

Nos ELISA, o resultado de uma reação é determinado pela leitura da absorbância ou densidade óptica (DO) obtida no final do ensaio. Usualmente, cada ensaio tem sua forma de calcular o ponto de corte (cut off) acima ou abaixo do qual as amostras são caracterizadas como reativas ou não reativas. Os cálculos são realizados a partir da média de DO dos controles.

Atenção

Verifique como é determinado o ponto de corte definido pelo fabricante de cada conjunto e se este encontra-se dentro dos valores aceitáveis para os controles e para as amostras.

Para os ensaios indiretos, os valores de DO acima do ponto de corte indicam que a amostra é reagente e abaixo do ponto de corte que a amostra é não reagente.

Existe, porém, uma zona circunvizinha, chamada zona cinza ou "borderline", dentro da qual não se pode ter certeza do resultado. As formas de calcular o ponto de corte e a zona cinza variam de acordo com o fabricante.

As amostras que apresentarem resultados positivos ou se encontrarem na zona cinza - as indeterminadas - devem ser submetidas a testes confirmatórios.



Como fazer o diagnóstico confirmatório quando o ELISA de triagem for reagente ou indeterminado?

O teste confirmatório pode ser um outro ELISA chamado de reação de bloqueio ou "blocking test", que é realizado em paralelo com a repetição do ensaio de triagem. Para isso, utilize a mesma amostra extraída para o primeiro teste.

Você terá um resultado definitivo por meio da comparação dos valores de densidade óptica obtidos nos dois ensaios.

A amostra será positiva para clamídia quando a densidade óptica obtida no ELISA de bloqueio for pelo menos 50% menor do que os valores obtidos no outro ELISA. Caso contrário, a amostra será negativa.

Se você não dispõe dos reagentes para o ELISA de bloqueio, use uma reação de imunofluorescência direta para o diagnóstico confirmatório.

Como preparar, a partir de uma amostra coletada para o ELISA de triagem, lâminas para confirmação por IFD?

1. pipete 250 microlitros do tampão de transporte, contendo a amostra clínica extraída do "swab" em tubo cônico tipo Eppendorff e identifique o tubo com o número da amostra;
2. centrifugue por 15 minutos a 13.000 a 15.000rpm;
3. despreze o sobrenadante e adicione 50 microlitros de tampão fosfato PBS;
4. ressuspenda o "pellet" ou depósito, agitando vigorosamente em um agitador de tubos até a completa dissolução do depósito;
5. identifique a lâmina com o número de amostra;
6. pipete 10 microlitros em cada demarcação da lâmina de imunofluorescência;
7. deixe o líquido das lâminas secar em temperatura ambiente; e
8. fixe o esfregaço pingando 3 gotas de metanol e deixe secar em temperatura ambiente.

A partir desse momento, siga as instruções que você já viu no título Imunofluorescência Direta deste manual.

O resultado positivo pela imunofluorescência confirma os resultados positivos indeterminados do teste de triagem por ELISA.

É possível fazer o diagnóstico das infecções por clamídia por sorologia?

As técnicas sorológicas têm pouco valor no diagnóstico das infecções genitais. São raros os casos em que se consegue detectar os anticorpos IgM anticlamídia, porque o primeiro contato com o antígeno de clamídia, na maioria das vezes, passa despercebido clinicamente. Quando se detectam anticorpos IgG, não é possível afirmar se foram produzidos em infecção recente, se correspondem a cicatriz sorológica ou a reações cruzadas. Os títulos de IgG são geralmente baixos, mesmo em indivíduos com infecção em curso.

A detecção de anticorpos IgM tem valor diagnóstico quando usada em casos de suspeita de pneumonia por *Chlamydia trachomatis* em recém-nascidos.

Em pessoas com sintomas de linfogranuloma venéreo, a sorologia pode ser útil quando se constata o aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG em duas amostras coletadas, com intervalo de 14 dias. Essas amostras são chamadas amostras pareadas.

O exame citopatológico pelo Papanicolaou pode detectar clamídia?

O exame citopatológico de esfregaços cervicais, corados pelo método de Papanicolaou, não é recomendado para o diagnóstico das cervicites por *Chlamydia trachomatis*. A técnica é de baixa sensibilidade e especificidade, devendo ser usada com extrema cautela, apenas como diagnóstico presuntivo, que deve obrigatoriamente ser confirmado pelas técnicas recomendadas pelo PN-DST/AIDS-MS.



Qual o método indicado para o controle após tratamento das infecções por clamídia?

Rotineiramente, não se faz controle de cura das infecções por clamídia, pois, até o momento, não foi identificada resistência da clamídia aos antimicrobianos preconizados para o seu tratamento.

Apesar disso, se o clínico considerar necessária a realização de controle após tratamento, o método recomendado é o isolamento em cultura celular. A coleta do material deve ser feita duas semanas após o término do tratamento. As técnicas de IFD e ELISA não devem ser utilizadas, pois podem ocorrer resultados falsos-positivos decorrentes da presença de antígenos de clamídia. Os antígenos de clamídia levam, no mínimo, duas semanas para serem eliminados do organismo.

CLAMÍDIA

ENSAYO DE CONTROL DE CALIDADE



Como preparar lâminas de controle de qualidade para IFD?

Se não for possível adquirir comercialmente essas lâminas, é possível prepará-las no laboratório.

Para o preparo dessas lâminas, utilize uma amostra clínica positiva para clamídia, no teste ELISA com D.O. acima de 2.

1. homogeneíze o conteúdo do tubo de ELISA positivo e pingue uma gota em cada lâmina controle;
2. deixe secar à temperatura ambiente;
3. fixe, pingando 3 ou 4 gotas de metanol;
4. deixe evaporar naturalmente;
5. identifique e embrulhe as lâminas, uma a uma, em papel alumínio;
6. guarde em congelador a -20°C ;
7. core duas lâminas de cada lote por IFD;
8. faça a leitura conforme referido no título Imunofluorescência Direta deste manual; e
9. caso o resultado não seja o esperado, despreze-as e faça um novo lote de lâminas-controle.

O mesmo procedimento deve ser utilizado para o preparo de lâminas-controle negativo, partindo-se do tampão com amostra clínica negativa para clamídia pelo teste ELISA.

Se o seu laboratório não realiza a metodologia ELISA, entre em contato com o PN-DST-AIDS TELELAB, para obter informações sobre como conseguir amostras positivas para o controle de qualidade.



Qual a importância de um protocolo de trabalho na realização de um teste?

O protocolo estabelece a ordem das amostras a serem testadas, de forma que qualquer técnico possa interpretar os resultados. Alguns métodos utilizam equipamentos para imprimir os resultados e o material impresso deve ser guardado junto com o protocolo. Veja, no item Anexos deste manual, alguns exemplos de protocolo.

Que outras medidas podem ser adotadas para assegurar resultados confiáveis?

Para assegurar que os resultados finais sejam confiáveis, são requisitos fundamentais:

utilizar amostras para controle de qualidade internos;
participar de um programa que forneça amostras-controle; e
participar de um programa de avaliação externa de qualidade.

O que é controle de qualidade interno?

Controle de qualidade interno de um ensaio corresponde ao uso de amostras positivas e negativas, obrigatoriamente incluídas em cada ensaio. Essas amostras podem ser fornecidas pelos fabricantes ou preparadas em seu laboratório.

O preparo ou uso de amostras-controle próprias constitui um excelente mecanismo de análise de possíveis variações lote a lote. Os controles também podem ser utilizados para avaliação da reprodutibilidade dos testes, em um mesmo ensaio (intra-ensaio) ou ensaios diferentes (interensaio), de um mesmo lote.

O que é um programa de avaliação externa da qualidade?

Um programa de avaliação externa da qualidade envolve um mecanismo de controle, no qual o laboratório recebe um painel de amostras que são incluídas na sua rotina. Os resultados obtidos são enviados a um Centro de Referência e analisados, possibilitando a avaliação confidencial do desempenho de cada laboratório.

Por que adotar medidas de controle e participar de avaliação externa da qualidade?

A adoção das medidas descritas permite ao laboratório garantir a qualidade dos procedimentos utilizados e conseqüentemente a confiabilidade dos resultados.

CLAMÍDIA

ANEXOS





EXEMPLO DE PROTOCOLO

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	
Protocolo nº: _____ __/__/__	Data: _____
Nome comercial do conjunto para diagnóstico: _____	
Fabricante: _____ Lote: _____ Validade: __/__/__	

Técnico responsável: _____

	A	B	C	D
1				
2				
3				
4				
5				

Observações "CUT OFF":

BIOSSEGURANÇA

BIOSSEGURANÇA



Para cuidar da sua segurança, da segurança de seus colegas de trabalho e do meio ambiente, obedeça aos procedimentos básicos de biossegurança em laboratórios:



Figura 1. Símbolo de risco biológico

Todo cuidado é pouco na manipulação de materiais biológicos, tais como soro, sangue ou secreções, fluidos orgânicos, tecidos, etc. Redobre suas precauções, pois esses materiais são potencialmente infectantes e muitas vezes estão contaminados com agentes etiológicos diferentes do que se está pesquisando, ou ainda desconhecidos. Nunca pipete com a boca e jamais cheire placas de cultura.

A inativação do soro em banho-maria a 56 °C por 30 minutos não elimina o potencial infectante da amostra.

Lembre-se de que, com a automação, aumentou muito o número de amostras processadas em laboratório e, conseqüentemente, aumentou também o risco de contaminação. Como você sabe, é difícil afirmar que um profissional se contaminou, de fato, em serviço. Isso faz com que as doenças infecto-contagiosas causadas por acidentes de trabalho não sejam devidamente notificadas; em conseqüência, as medidas de segurança envolvendo o biorrisco acabam não sendo implementadas.

Use sempre Equipamento de Proteção Individual (EPI): avental ou jaleco longo de mangas compridas e punho retrátil, luvas descartáveis, óculos de proteção, pipetadores manuais ou automáticos e, quando for o caso, protetor facial.

Os EPI são regulamentados pelo Ministério do Trabalho e seu uso visa a minimizar a exposição do técnico aos riscos e evitar possíveis acidentes nos laboratórios. Note que, às vezes, os profissionais de laboratório precisam de um tempo para se adaptar ao uso dos equipamentos na sua rotina. O importante é que você se adapte e incorpore a utilização dos EPI à sua prática profissional. O uso indevido dos EPI, ao invés de proteger, poderá ocasionar acidentes.

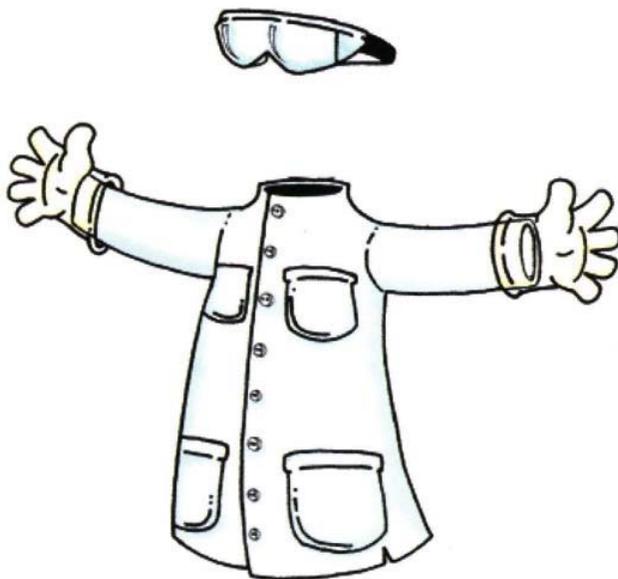


Figura 2. Ilustração dos principais equipamentos de proteção individual (EPI)

Evite a formação e dispersão de aerossóis.

Aerossóis são micropartículas sólidas e líquidas com dimensões aproximadas entre 0,1 e 50 micra que podem, caso contenham microorganismos, permanecer em suspensão e plenamente viáveis por várias horas.

A pipetagem, flambagem de alças, abertura de frascos e ampolas, manipulação de seringas, agulhas, lancetas, lâminas e outros assemelhados podem gerar e propagar aerossóis.

Abertura de frascos, ampolas, tubos e garrafas de cultura requer cuidados especiais. Envolve a parte a ser aberta com um pedaço de gaze. Utilize um pedaço de gaze para cada material, prevenindo assim a contaminação cruzada. Descarte-a imediatamente em hipoclorito de sódio a 2%.

Centrífugas, agitadores e maceradores, quando manipulados sem as precauções e abertos antes da total parada ou término da operação, igualmente podem contaminar o ambiente laboratorial.

Jamais reencape agulhas. Esse procedimento é uma das principais causas da contaminação de profissionais de saúde por microorganismos, existentes no sangue e em outros fluidos orgânicos, como por exemplo, o vírus da hepatite B e o HIV. Após a coleta, você deve descartar esse material diretamente em recipiente de paredes rígidas com tampa, contendo hipoclorito de sódio a 2% em volume superior a metade do recipiente.

Lembre-se: cada mililitro de sangue contaminado com o vírus da hepatite B contém 100.000.000 de partículas virais, que podem permanecer viáveis por até uma semana. Basta 1(uma) dessas partículas para contaminar uma pessoa.

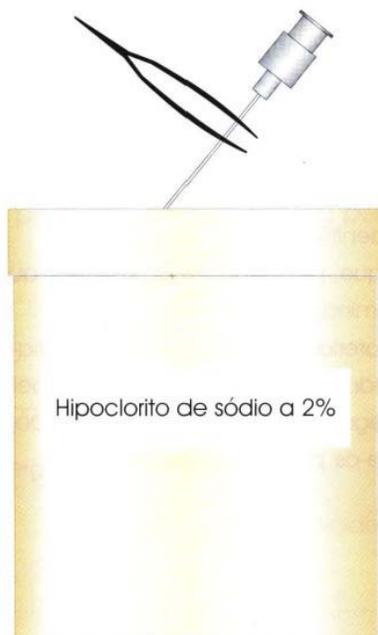


Figura 3. Ilustração do descarte de agulha em recipiente apropriado.

Reduza ao máximo o manuseio de resíduos, em especial, os perfurocortantes. Descarte o rejeito perfurocortante diretamente em recipiente de paredes rígidas, contendo hipoclorito de sódio a 2%. Deixe em imersão total no mínimo por 24 horas e, em seguida, faça a autoclavação desse material.

Esta é uma regra básica para diminuir os riscos de acidente nos laboratórios. É fundamental que os materiais perfurocortantes sejam autoclavados depois da imersão em hipoclorito de sódio a 2%. Só então esses materiais devem ser encaminhados ao lixo hospitalar. O acondicionamento dos resíduos de laboratório deve seguir a Norma Brasileira (NBR) 9190 da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, que recomenda sacos brancos leitosos para os resíduos potencialmente infectantes e hospitalares e escuros para o lixo comum.

Os profissionais responsáveis pela limpeza e conservação devem ser bem orientados e usar equipamentos de proteção. Todos os recipientes para descarte devem estar identificados.

Lembre-se de que, pela legislação brasileira, quem gera o resíduo é o responsável pela sua eliminação e controle.

No caso dos materiais reutilizáveis, como vidraria e utensílios, deposite-os em recipiente contendo o desinfetante próprio, pelo tempo de contato recomendado e, em seguida, faça a autoclavação. Depois, lave normalmente esses materiais e guarde-os para uso posterior.

Identifique e sinalize os principais riscos presentes em seu laboratório. Produtos e áreas que oferecem risco devem ser marcados com os devidos símbolos internacionais em etiquetas auto-adesivas padrão.

Veja, a seguir, os principais símbolos associados aos riscos em laboratórios.



Figura 4. Símbolo de risco biológico para entrada de laboratórios.

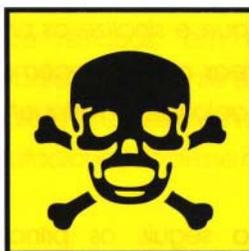
**Risco Biológico****Tóxico****Risco Radioativo****Explosivo****Inflamável****Corrosivo****Irritante****Comburente**

Figura 5. Principais símbolos internacionais associados aos riscos em laboratórios.

Verifique sempre as condições de funcionamento dos Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC): extintores de incêndio, chuveiros de segurança, lava-olhos, pia para lavagem de mãos, caixa de areia e cabine de segurança biológica.

Existem três tipos de cabines de segurança biológica disponíveis no mercado: as de classe I, classe II e classe III. São recomendadas para o uso em laboratórios clínicos as de classe II. Veja a figura 6, na página seguinte.

Procedimentos que devem ser observados na cabine de segurança biológica:

- /// descontamine a superfície interior, antes e depois do uso, com gaze estéril embebida em desinfetante adequado;
- /// ligue a cabine e a luz ultravioleta 20 minutos antes e deixe tudo ligado pelo mesmo tempo ao final de sua utilização;
- /// use avental de mangas longas, luvas descartáveis e máscara;
- /// não efetue movimentos rápidos ou bruscos dentro da cabine e evite operações que causem turbulência;
- /// não use bico de Bunsen, pois pode acarretar danos ao filtro HEPA e causar desequilíbrio do fluxo de ar. Se necessário, use incinerador elétrico ou microqueimador automático; e
- /// mantenha as grelhas anteriores e posteriores da cabine desobstruídas. A cabine não é um depósito. Evite guardar equipamentos ou quaisquer outros objetos no seu interior.

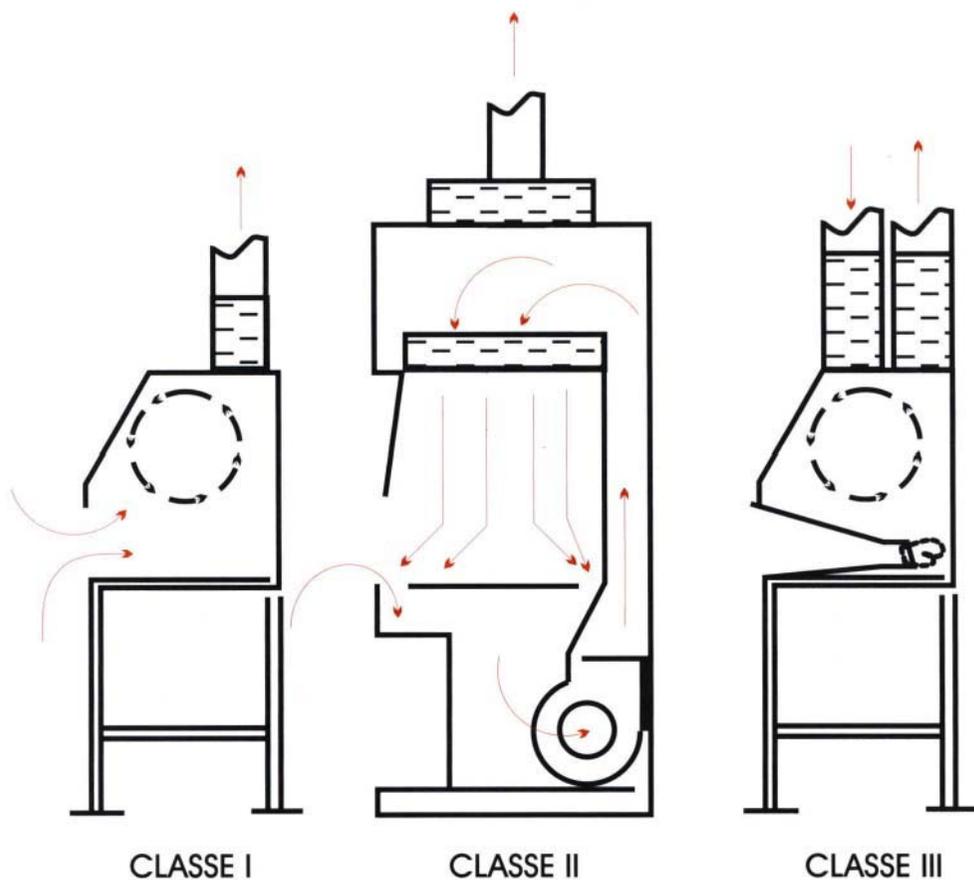


Figura 6 : ilustração das cabines de segurança biológica - classes I, II e III.

As cabines de classe I e II são consideradas como barreira de proteção parcial e a de classe III é uma barreira de proteção total.



Para descontaminação pessoal, de equipamentos e superfícies fixas, utilize desinfetantes eficientes e adequados. Use sempre produtos registrados no Ministério da Saúde.

Não existe um desinfetante único que atenda a todas as necessidades. É fundamental conhecer os diversos agentes químicos e sua compatibilidade de uso para evitar custos excessivos e utilização inadequada.

Para a descontaminação de amostras biológicas na rotina dos laboratórios clínicos, recomendamos os compostos liberadores de cloro. O mais comumente utilizado é o hipoclorito de sódio a 2%. Sua forma mais ativa é o ácido hipocloroso (HOCl), que é formado em soluções com pH entre 5 e 8. A eficácia do cloro decresce com o aumento do pH e vice-versa. Cabe lembrar que a atividade desse ácido é diminuída na presença de matéria orgânica, fato que deve ser considerado quando aplicado em superfícies contendo sangue e outros líquidos corpóreos. Os hipocloritos têm sua estabilidade dependente de fatores como concentração, temperatura, pH, luz, metais e prazo de validade.

Os hipocloritos são corrosivos para metais. Objetos de prata, alumínio e até mesmo de aço inoxidável são atingidos, quando imersos em soluções rotineiramente utilizadas em laboratório. Hipoclorito de sódio é tóxico e causa irritação na pele e olhos. Se ingerido, provoca corrosão das membranas e mucosas e sua inalação causa irritação severa no trato respiratório. Jamais misture os hipocloritos com outras substâncias químicas, tais como desinfetante, álcool, soluções germicidas, etc.

Após o tratamento por 24 horas com hipoclorito de sódio a 2%, os materiais devem ser autoclavados. A autoclavagem é recomendada tendo em vista a possibilidade do hipoclorito não atingir as partes do material a ser esterilizado. Caso isso não seja possível, a alternativa é o método de fervura por período não inferior a 30 minutos.

Observe, na tabela abaixo, a indicação de alguns agentes químicos e seu espectro de ação antimicrobiana.

Eficiência antimicrobiana de alguns agentes químicos desinfetantes frente a agentes microbianos

	Bactérias	Vírus lipofílicos	Vírus hidrofílicos	Microbactérias	Fungos	Esporos bacterianos
Etanol	+	+	-	+	V	-
Formaldeído	+	+	+	+	+	+
Glutaraldeído	+	+	+	+	+	+
Comp. Cloro	+	+	+	+	+	+
Fenóis	+	+	-	+	+	-
Quaternários de amônia	+	+	+	-	+	-
Iodóforos	+	+	+	-	+	-

(+) Atividade

(-) Ausência de atividade

(V) Variável de acordo com o microorganismo

Tenha muito cuidado com a manipulação e estocagem de substâncias químicas. Leia com atenção as informações contidas nos rótulos.

A estocagem de matéria-prima deve ser feita em armários apropriados, bem ventilados, ao abrigo da luz solar e calor. É importante observar a incompatibilidade entre as diferentes substâncias.

Sempre que recomendado pelo fabricante, os agentes químicos devem ser manipulados em capelas de exaustão química devidamente instaladas. Atenção: não confunda capela de exaustão química com cabine de segurança biológica.

Veja a seguir os riscos relacionados a cada categoria química:

Categoria química e riscos relacionados

Grupo Químico	Risco
Ácidos	Corrosão
Bases	Corrosão
Cianetos e Sulfetos	Envenenamento
Líquidos Inflamáveis	Incêndio
Sólido Inflamável	Incêndio

Seja sempre consciente da importância de suas ações na preservação da biossegurança em seu local de trabalho:

- /// lave as mãos antes e depois de qualquer procedimento laboratorial;
- /// nunca pipete com a boca;
- /// jamais cheire placas de cultura;
- /// dentro do laboratório, não fume, não coma, não beba, não prepare refeições;
- /// quando estiver usando luvas, não manuseie objetos de uso comum, como telefones, maçanetas de portas e janelas, jornais, revistas, etc.;
- /// não guarde alimentos ou bebidas em geladeiras e congeladores para armazenagem de material biológico; e
- /// vacine-se rotineiramente contra a hepatite B.

Seguindo essas recomendações, você vai estar contribuindo para a diminuição de acidentes

Se acontecer um acidente de trabalho em seu laboratório, notifique imediatamente a sua chefia.



Considerações finais

Muitas das atividades aqui descritas já fazem parte do seu cotidiano. Faça uma reflexão sobre o que acabou de ler e verifique o que pode ser mantido, modificado e incorporado a seu trabalho e ao seu laboratório para que a sua prática profissional se desenvolva de acordo com os procedimentos técnicos e cuidados de biossegurança recomendados pelo **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS**, do Ministério da Saúde. As questões colocadas a seguir facilitarão essa reflexão.

Condições gerais do laboratório

- /// As áreas de circulação estão desobstruídas?
- /// Qual a situação geral quanto ao aspecto de limpeza?
- /// Qual o estado de conservação e manutenção de pisos, escadas, paredes e tetos?
- /// O local de trabalho está adequado para atividades envolvendo o risco biológico?
- /// As bancadas e demais mobiliários do laboratório estão em condições de uso?
- /// Existem bancadas apropriadas para trabalhos com solventes e demais substâncias químicas corrosivas?
- /// Existe pia diferenciada para lavagem das mãos no laboratório?
- /// Existem mecanismos de contenção que previnam a entrada de insetos e roedores?
- /// Existem programas de manutenção preventiva de equipamentos?

Estocagem

- /// Os produtos armazenados e a área de estocagem estão organizados com os devidos cuidados de segurança?
- /// Existe o cuidado de se estocar materiais e/ou substâncias incompatíveis separadamente?



Local de higiene pessoal e de alimentação

- /// O local é mantido limpo e em condições de higiene?
- /// Existe água potável disponível?
- /// Existem sabão e toalha em condições de uso?
- /// Existe local para troca de roupa e guarda de objetos pessoais?
- /// Existe área para alimentação separada da área de laboratório?
- /// Existe adequada organização para coleta de lixo e demais rejeitos (não infecciosos)?

Refrigeração e ventilação

- /// A temperatura de trabalho está entre 20 e 26°C?
- /// As janelas estão protegidas contra o excesso de luz solar?
- /// Existe ventilação adequada, especialmente nas salas com cabines de fluxo laminar?

Iluminação

- /// A iluminação geral é adequada?
- /// Existe iluminação dirigida nas bancadas de trabalho?

Serviços

- /// O laboratório tem suficiente abastecimento de água, energia elétrica e gás?
- /// Existe adequada manutenção de fusíveis, lâmpadas e cabos elétricos?
- /// A limpeza e higienização das caixas d'água são realizadas com periodicidade recomendada?

Segurança geral

- /// O laboratório é devidamente fechado e seguro quando não está ocupado?
- /// As portas e janelas são mantidas devidamente fechadas?
- /// Os materiais tóxicos e equipamentos de risco são estocados em área segura?

Prevenção de incêndio

- /// Existe sistema de alarme?
- /// As passagens pelas portas de emergência estão desobstruídas?
- /// O sistema de detecção de incêndio está em bom funcionamento e é regularmente testado?
- /// Existe sinalização de emergência?
- /// Existem extintores de incêndio para os diversos tipos de materiais e em quantidade suficiente?
- /// Os extintores estão dentro do prazo de validade?
- /// Existe sinal de "não fumar" na área de laboratório?
- /// A equipe está treinada em combate a incêndio?

Estocagem de líquidos inflamáveis

- /// O local está separado do prédio principal?
- /// Existe ventilação suficiente para retirar vapores?
- /// O local está devidamente sinalizado?
- /// Existem lâmpadas seladas para proteção contra ignição nos vapores?
- /// Existe advertência de "não fumar"?



Risco com eletricidade

- /// As instalações estão de acordo com os padrões estabelecidos pela ABNT?
- /// Existe fio de terra? Os equipamentos estão devidamente aterrados?
- /// Os equipamentos com potencial de risco de desligamento estão devidamente ligados a um circuito de emergência para os casos de queda ou interrupção de energia?
- /// Os cabos de conexão aos diversos equipamentos estão em perfeito estado de manutenção?
- /// Cada equipamento está ligado em uma tomada; evita-se o uso de benjamim?
- /// Todas as tomadas têm sua voltagem identificada?
- /// Você sabe onde fica o quadro-geral de força da sua unidade?

Gases e líquidos comprimidos

- /// Os diversos tipos de gases estão devidamente identificados?
- /// Os cilindros possuem válvulas de segurança?
- /// Existe advertência de não-utilização de óleo nas válvulas?
- /// Os cilindros estão devidamente seguros contra quedas?
- /// Existe ventilação suficiente para evitar a formação de bolsões de gases e explosões?

Proteção pessoal

- /// Existem em quantidade suficiente:
 - Lava-olhos?
 - Chuveiros de emergência?
 - Proteções contra radiações, incluindo os dosímetros?
 - Máscara contra partículas?
 - Luvas descartáveis?
 - Pipetadores manuais e/ou automáticos?
 - Óculos de proteção e outros?



Segurança e saúde ocupacional

- /// Existe serviço de saúde ocupacional?
- /// Existe caixa com materiais para primeiros socorros?
- /// Existem profissionais treinados em primeiros socorros?
- /// Existem informações sobre como agir em caso de emergência, tais como: telefone de hospitais, pronto-socorros e bombeiros?
- /// Existe um programa de vacinação atualizado?
- /// Existe sinalização educativa para prevenir o risco?

Equipamento de laboratório

- /// Os equipamentos estão validados e certificados quanto a seu uso?
- /// Existe procedimento de desinfecção de equipamentos antes de enviar-los à manutenção?
- /// As cabines de segurança biológica e química são regularmente testadas?
- /// As autoclaves estão validadas?
- /// As centrífugas, rotores e frascos têm seus tempos de utilização devidamente anotados?
- /// Vidrarias quebradas e trincadas são descartadas?
- /// Existem recipientes adequados para descartar frascos quebrados e material perfurocortante?
- /// As capelas de exaustão para manipulação estão devidamente sinalizadas?
- /// Suas balanças estão certificadas pelo INMETRO?
- /// Seus congeladores, geladeiras, fornos, estufas ou equipamentos termo-reguláveis possuem sinais de controle e registro de temperatura?

Material infeccioso, químico e radioativo

- /// Os materiais biológicos são recebidos em condições de segurança?
- /// Utilizam-se luvas descartáveis, quando se está manipulando material biológico?
- /// As bancadas são desinfetadas com a devida frequência?
- /// Existe protocolo de descarte de material contaminado?
- /// Os desinfetantes são apropriados e devidamente validados?
- /// As substâncias estão devidamente etiquetadas?
- /// Existe cartaz com os riscos e categorias toxicológicas das diversas substâncias?
- /// O estoque de radioisótopos é devidamente controlado?
- /// Existe procedimento de descarte de substâncias químicas e radioisótopos?
- /// Existem procedimentos que visam a evitar contato entre substâncias químicas incompatíveis?

Utilize este manual, junto com o vídeo, como fonte permanente de consulta. Mantenha este manual sempre ao seu alcance e faça dele um instrumento a mais de trabalho.

Você tem comunicação direta e gratuita com o:

TELELAB - PN-DST/AIDS – MS

Telefax gratuito: 0800 - 61 – 2436





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNAES,S.L.; PÉTREOS, E.M.; DELA MAZA, L.M. The effect of media and temperature on the storage of *Chlamydia trachomatis*. Am. J. Clin. Pathol., 81: 237-239, 1984.
- ADLER, M.W. ABC of sexually transmitted diseases: pregnancy and neonates. Br. Med. J., 288 (6417): 624-627, 1984.
- 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.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. MMWR 42 (RR-12), 1993.
- GRAYSTON, J.T.; KUO, C-C; CAMPBELL, L.A. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int. J. Syst. Bacteriol., 39 (1): 88-90, 1990.
- HAMMERSCHLAG, M.R. *Chlamydia pneumoniae*. A new respiratory pathogen. Infect. Dis. Newsletter. 11 (1): 1-4, 1992.
- HARE, M.J. & THIN, R.N. Chlamydial infections of lower genital tract of women. Br. Med. Bull. 39 (2): 138-144, 1983.
- KIVIAT, N.B. et alli. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. II. Confirmation of *Chlamydia trachomatis* infection by direct immunofluorescence using monoclonal antibody. JAMA, 253 (7): 997-1000, 1985.



MARDH, P.A. Bacteria, chlamydia and mycoplasmas. In: HOLMES, K.K. et alii. Sexually transmitted diseases. New York, McGraw-Hill 1984 cap 69, pp 829-56.

MARDH, P.A.; PAAVONEN, J.; PUOLLAKKAINEN, M. Chlamydia. New York: Plenum Medical Book Company, 1989. 370p.

ORIEL, J.D.; RIDGWAY, G.L. Genital infection in men. Br. Med. Bull., 39 (2): 133-137, 1983.

SCHATTER, J. Biology of Chlamydia trachomatis. In: HOLMES, K.K. et alii. Sexually transmitted diseases. New York, Mc Graw-Hill, 1984. cap 23, p.243-257.

LA SCOELA, L.J. The value of nonculture chlamydial diagnostic test. Clin. Microbiol. Newsletter, 13 (3): 21-24, 1991.

WEISBURG, N.G. Eubacterial origin of Chlamydiae. J. Bacteriol., 167: 570-574, 1986.

Agradecimentos: À equipe do:
Instituto de Saúde Pública do Distrito
Federal - ISDF;
Ao Laboratório ControlBio, São Paulo; e
Ao Hospital Universitário - Universidade
Federal de Santa Catarina - UFSC.

Vídeo, projeto gráfico, arte-final e impressão:





Ministério da Saúde
Secretaria de Assistência à Saúde - SAS
Programa Nacional de DST/AIDS

