CULTURA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE

Neisseria gonorrhoeae

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
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

Cultura, isolamento e identificação *da Neisseria gonorrhoeae*. - Brasília: Ministério *da Saúde,* Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. 1997,
72p. : il. (Série TELELAB)

1. *Neisseria gonorrhoeae* 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 **Drª. Lair Guerra de Macedo Rodrigues**, *exemplo de coragem e liderança, dedicamos este trabalho.*

Pedro Chequer

APRESENTAÇÃO 04

INTRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DA *Neisseria gonorrhoeae* 09
Introdução 09
características da Neisseria gonorrhoeae 10
amostras indicadas 11
cultura 12
condições para o crescimento da Neisseria gonorrhoeae 13

IDENTIFICAÇÃO, CULTURA E ISOLAMENTO 17
meios de transporte 17
meios de cultura 18
meios de identificação 19
fluxograma 20
obtenção da atmosfera de CO_2 21
reconhecimento da Neisseria gonorrhoeae no meio de Thayer Martin22
características morfotintoriais da *Neisseria gonorrhoeae* 22
prova de catalase 23
prova de oxidase 24
prova de degradação de carboidratos 25
outros métodos de identificação de *Neisseria gonorrhoeae* 27
β-lactamase ou penicilinase 27
prova da cefalosporina cromogénica 30
manutenção de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* 31

CONTROLE DE QUALIDADE 35

PREPARO DOS MEIOS 39
meio de Amies 39
meio de Thayer Martin modificado 40
suplemento definido de Kellogg's 41
meio para degradação de açúcares 42
preparo de fitas para prova de oxidase 43
meio de BHI + glicerol 44

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 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 tranqüilidade 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, os testes e as técnicas recomendados pelo Programa Nacional de DST/AIDS-MS para a cultura, o isolamento e a identificação de *Neisseria* gonorrhoege;
- executar a cultura, o isolamento, a identificação de *Neisseria* gonorrhoeae e as rovas especiais, obedecendo aos critérios técnicos, critérios de controle de qualidade e cuidados de biossegurança recomendados.

Neisseria gonorrhoeae

INTRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS
DA *Neisseria gonorrhoeae*

INTRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS
Neisseria gonorrhoeae

A gonorréia é uma doença sexualmente transmissível (DST), definida como um processo infeccioso causado pela *Neisseria gonorrhoeae*. A descrição do agente etiológico da gonorréia foi feita por Albert Neisser em 1879 e sua transmissão dá-se por meio do contato sexual. A transmissão vertical causa a oftalmia gonocócia do recém nascido.

O risco de contágio para o sexo masculino, após contato sexual com parceira infectada, é de 20% e, no caso de reexposição, este índice poderá elevar-se a 90%. Nos homens e em cerca de 20% das mulheres, os sintomas surgem cerca de 2 a 8 dias após o contágio. Para o sexo feminino, o risco de infecção é em torno de 80%. Quando as mulheres são reexpostas,esse número aumentá para mais de 90%. Dentre as mulheres infectadas, cerca de 60% a 80% não apresentam sintomas.

Epidemiologicamente, o fato de 60% a 80% das mulheres não apresentarem sintomas ressalta a importância do controle da população infectada para interrupção da cadeia de transmissão. A gonorréia, no homem, quando não tratada, evolui para complicações do tipo epididimite, prostatite e outras, culminando com o quadro de esterilidade. Já na mulher, as complicações são mais severas, evoluindo para Doença Inflamatória Pélvica (DIP) e esterilidade, chegando, em alguns casos, a óbito.

Os principais métodos de diagnóstico da gonorréia são a bacterioscopia e a cultura. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica a bacterioscopia como método de escolha para o dignóstico da gonorréia no homem, em função de sua sensibilidade e especificidade. Já para as mulheres, em função do número de casos assintomáticos e da presença de um ecossistema vaginal, é indicada a cultura de amostras do canal endocervical.

Neste manual, estão apresentadas as recomendações do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Ministério da Saúde - PN-DST/AIDS, para transporte, cultivo, isolamento e identificação da *Neisseria gonorrhoeae,* além das provas especiais para detecção de cepas de *Neisseria* gonorrhoeae resistentes à penicilina.

Quais as características da Neisseria gonorrhoeae?

A *Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, na forma de diplococos "riniformes" ou "grãos de café", característica do gênero de Neisser. Esses diplococos medem 0,6nm por 1,0nm e apresentam-se aos pares, com faces côncavas adjacentes, ou seja, voltadas entre si. Esta espécie adere nas superfícies de células epiteliais do hospedeiro, por meio de uma estrutura chamada *pili* (ou pêlo) que é um apêndice filamentoso de origem protéica, da superfície bacteriana.

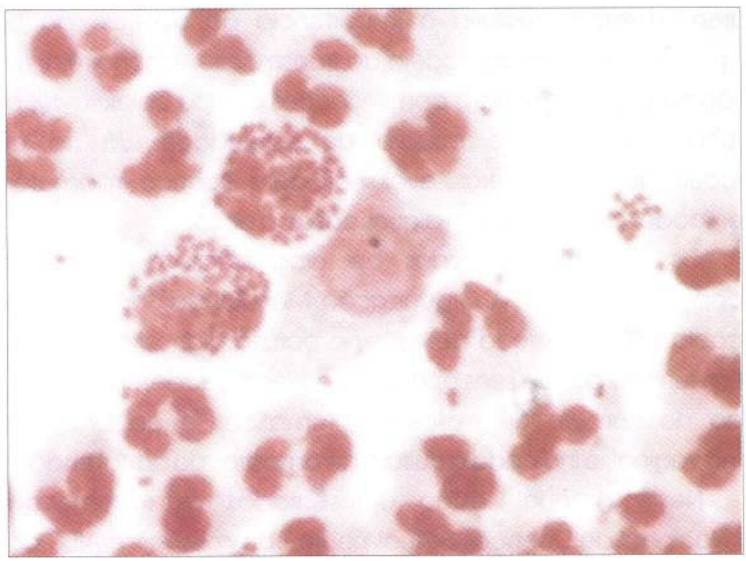


Figura 1. diplococos gram-negativos intracelulares sugestivos de Neisseria gonorrhoeae

Quais as amostras clínicas indicadas para cultivar, isolar e identificar o agente etiológico da gonorréia?

A cultura da *Neisseria gonorrhoeae* pode ser realizada nas seguintes amostras:

- secreções colhidas nos seguintes sítios:
  - canal endocervical;
  - uretra masculina e feminina;
  - orofaringe;
  - canal anal;
  - conjuntiva;
  - articulações;
  - lesões; e
  - sangue.

O que é uma cultura e quando deve ser utilizada?

Cultura é o método de crescimento e isolamento do agente etiológico em meios específicos. Deve ser realizada nos seguintes casos:

a) em pacientes do sexo masculino, é recomendado cultivo da secreção uretral, sempre que, após exame bacterioscópico negativo, persistir a suspeita clínica, ou em casos de suspeita de resistência ao tratamento. Pode ainda ser realizada em amostras da orofaringe e do canal anal, quando houver indicação;

b) em pacientes do sexo feminino é recomendado cultivo da secreção endocervical como rotina diagnóstica. Após a correta anamnese ou ainda quando houver sinais clínicos, recomenda-se o cultivo de amostra da orofaringe e do canal anal;

c) na oftalmia gonocócica, em recém-nascidos ou em adultos;

d) na infecção disseminada, por meio da cultura de sangue; e

e) no seguimento de tratamento.

Quais são as condições indispensáveis para o crescimento da Neisseria gonorrhoeae em meio de cultura?

O sucesso da cultura do gonococo depende de cinco requisitos ambientais básicos:

- semeadura imediata no meio de transporte ou meio de TMm;
- atmosfera de CO, em torno de 3% a 7%;
- teor de umidade em cerca de 90%;
- incubação à temperatura de 35,5° a 36,5°C; e
- meio de cultura adequado.

Neisseria gonorrhoeae

IDENTIFICAÇÃO, CULTURA E ISOLAMENTO

IDENTIFICAÇÃO, CULTURA E ISOLAMENTO

Quais os meios de transporte recomendados e suas características?

O PN-DST/AIDS recomenda o meio de Amies para o transporte de amostras de secreções suspeitas. Este meio preserva o gonococo em boas condições para o cultivo por até 8 horas.

O meio de Amies contém um tampão de sal inorgânico balanceado e carvão mineral para absorver as toxinas inibidoras presentes no material.

Na evolução dos meios de transporte de espécimes biológicos, vários outros sistemas foram desenvolvidos para *Neisseria gonorrhoeae* e colocados à disposição nos mercados nacional e internacional. Estes sistemas baseiam-se na utilização do meio indicado para o cultivo de diplococos Gram-negativos patogênicos, que é o meio de Thayer-Martin modificado (TMm). Alguns são apresentados na forma de garrafas ou tubos de ensaio, contendo aproximadamente 30ml de meio disposto em ágar inclinado "bico de flauta", proporcionando uma superfície maior para a semeadura. Contém, ainda, atmosfera de 3 a 10% de CO_2, requisito obrigatório para o crescimento das Neisserias. Para a semeadura neste meio, deve-se tomar o cuidado de manter o frasco em posição vertical, garantindo a permanência de CO_2 que, por ser mais pesado que o ar, tende a ocupar o fundo do frasco. Após a semeadura, deve ser incubado em estufa a 35,5° - 36,5°C, por um período de 24 horas. Este sistema permite o primo-isolamento no próprio meio de transporte e também se presta à identificação presuntiva.

Um outro tipo de sistema de transporte para *a Neisseria gonorrhoeae* foi desenvolvido em uma placa plástica, retangular, contendo o meio de TMm. Esta placa apresenta um orifício lateral onde é colocado um comprimido gerador de CO_2, sendo depois hermeticamente lacrado em um saco plástico. Este sistema apresenta grandes vantagens quando comparado aos demais, por apresentar uma superfície maior, facilitando a semeadura e a observação das colônias isoladas, além de gerar o próprio CO_2. Este sistema é o mais apropriado ao trânsito postal, entretanto é muito caro.

Quais os meios que podem ser utilizados para a cultura da Neisseria gonorrhoeae e qual o recomendado pelo PN-DSTIAIDS-MS?

Para a cultura da *Neisseria* gonorrhoeae, são necessários meios enriquecidos e seletivos. A seletividade assegura o crescimento e desenvolvimento da *Neisseria gonorrhoeae*. Em meios não seletivos, ocorre o fenômeno da competitividade com outras bactérias, constituintes de floras normais ou não, presentes nos matérias coletados. A *Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria fastidiosa que exige suplementos especiais para o seu crescimento, por isso os meios são enriquecidos com o suplemento VX.

Dentre os meios de cultura seletivos para o cultivo da *Neisseria gonorrhoeae,* os mais tradicionais são o Thayer Martin modificado, Martin Lewis e o NYC (New York City), que diferem entre si pelas substâncias inibidoras utilizadas. O meio recomendado pelo PNDST/AIDS, por sua comprovada eficiência e simplicidade de produção, é o Thayer Martin modificado (TMm),

O PN-DST/AIDS recomenda rigoroso controle da qualidade em todos os lotes dos meios utilizados.

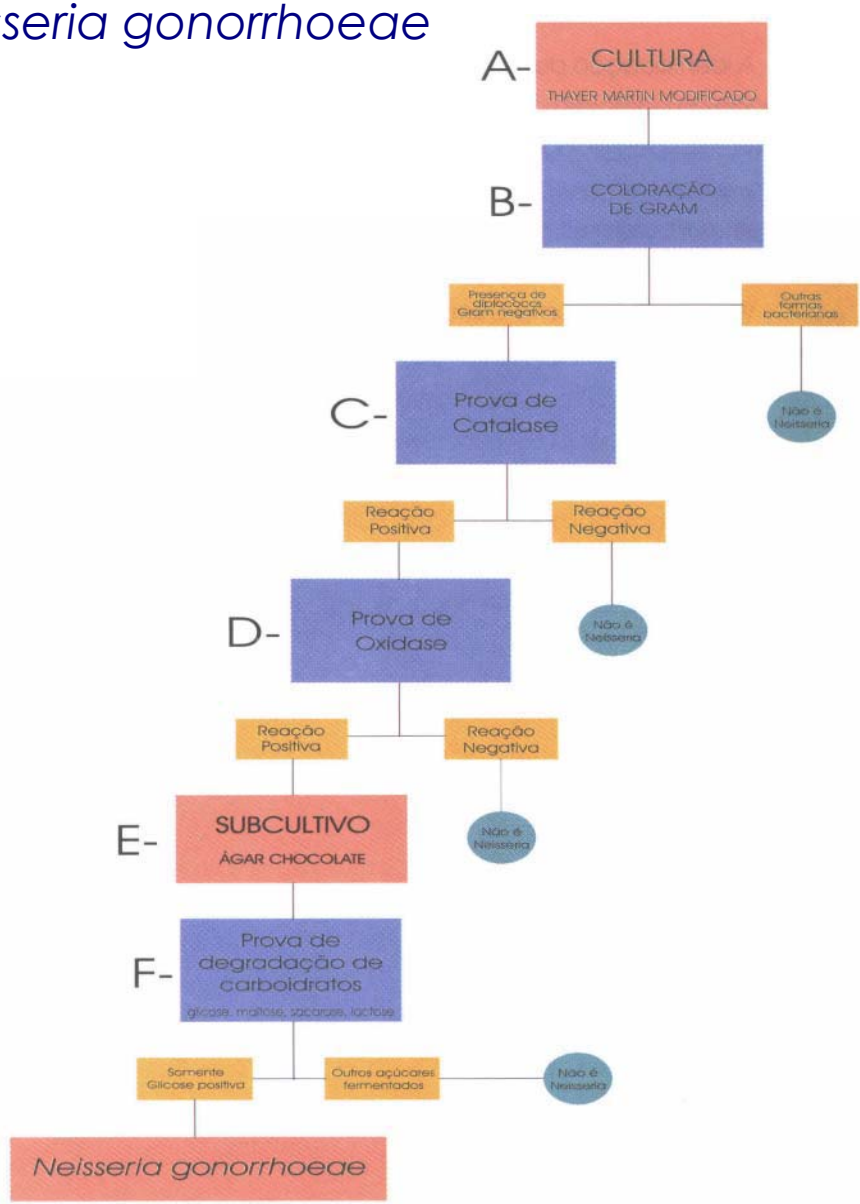
Quais os meios utilizados para identificação da Neisseria gonorrhoeae?

A identificação da *Neisseria gonorrhoeae* é feita em meios que revelam a utilização de carboidratos (açúcares), além de outras provas. Para a realização da prova da degradação dos carboidratos entre as espécies do gênero *Neisseria,* é necessário um meio com base enriquecida onde foram adicionados diferentes carboidratos. Além disso, realizam-se provas específicas como coloração de Gram, prova de catalase, prova da oxidase.

Veja, no fluxograma a seguir, a seqüência em que essas provas devem ser realizadas.

FLUXOGRAMA PARA CULTURA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA

Neisseria gonorrhoeae



Como obter a atmosfera de CO_2?

Se você possuir uma estufa de CO_2 em seu laboratório, é só calibrar a injeção de CO_2 e garantir que este equipamento esteja proporcionando uma atmosfera entre 3% e 7% de CO_2. No processo de calibragem, aconselhamos a regulagem para 5% de CO_2. Se você não possuir este equipamento em seu laboratório, utilize o método da vela ou do comprimido efervescente.

Para executar o primeiro método, você deve fixar uma vela na parede da lata ou sobre a tampa de uma placa de Petri, Acenda a vela, tampe bem a lata e vede com fita adesiva ou esparadrapo, Certifique-se de que a vela usada não é tóxica, usando cepas-controle.

O mecanismo de funcionamento deste sistema consiste na queima do oxigênio (O_2) pela chama, transformando em dióxido de carbono (CO_2). Lembre-se de que a vela deverá ser colocada na parte mais superior da lata, pois o CO_2 é mais pesado do que o O_2, que subirá e entrará em combustão. Este sistema proporciona uma atmosfera em torno de 3% de CO_2.

O outro método consiste na colocação de um comprimido efervescente sobre um chumaço de algodão embebido em água na tampa de uma placa de Petri. Tampe bem a lata como no método da vela.

O mecanismo de funcionamento desse método é semelhante ao da vela. A diferença é que o CO_2 é gerado a partir do comprimido efervescente. A atmosfera de CO_2 obtida com este método fica em torno de 7%.

Como reconhecer uma colônia de Neisseria gonorrhoeae no meio de cultura de Thayer Martin? (Etapa A do fluxograma)

As colônias de *Neisseria* gonorrhoeae são normalmente pequenas, brilhantes, viscosas e extremamente aderidas ao meio, difíceis de serem retiradas do meio de cultura como auxílio da alça bacteriológica. Essa aderência deve-se à presença dos *pili* (pêlos). Quanto mais *pili* possui uma cepa, mais aderida fica ao meio.

Às vezes, na cultura, aparecem colônias grandes, com aspecto opaco e tonalidade acastanhada. Essas cepas não possuem *pili* e são facilmente removidas do meio com alça bacteriológica.

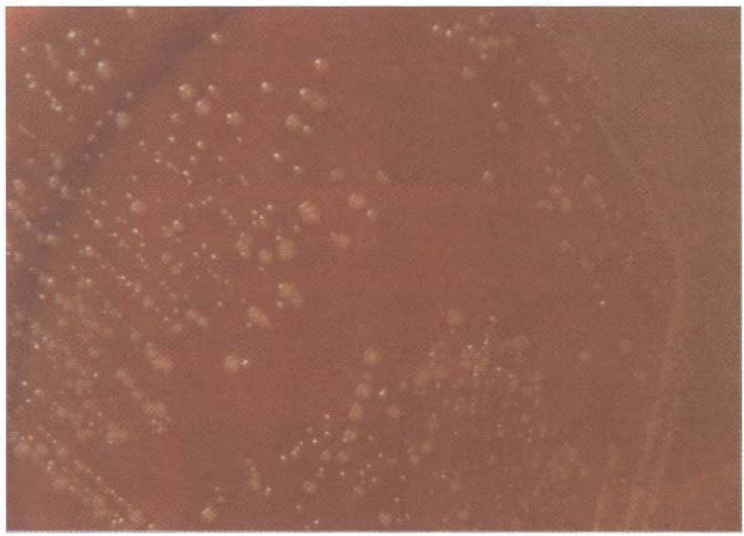


Figura 1 : colônias características de *Neisseria gonorrhoeae*

Como fazer a confirmação das características morfotintoriais da Neisseria gonorrhoeae pelo método de Gram? (Etapa B do fluxograma)

Após 24 a 48 horas de incubação, verifique o crescimento nas placas de Thayer Martin modificado. Selecione uma colônia suspeita. Pegue essa colônia com alça bacteriológica e transfira-a para a superfície de uma lâmina de vidro, contendo uma gota de solução salina estéril.

Deixe secar e faça a coloração de Gram conforme demonstrado no curso TELELAB - *Técnica de coloração de Gram*. Observe, sob microscópio, em objetiva de imersão (100X). O achado de estruturas morfológicas compatíveis com o gênero de Neisser (diplococos gram-negativos reniformes) confirma que a bactéria crescida é uma *Neisseria*.

Como fazer a prova de catalase? (Etapa C do fluxograma)

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, pegue uma colônia suspeita do meio de TMm e homogeneíze sobre uma lâmina limpa, seca e desengordurada. Em seguida, adicione uma gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) a 10 volumes, que corresponde a uma solução a 3%. A reação de catalase detecta uma enzima hemoprotéica, que cataliza a quebra do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Na reação positiva, ocorrerá desprendimento de pequenas bolhas e, na reação negativa, o líquido permanecerá inalterado. *A Neisseria gonorrhoeae* caracteriza-se por apresentar reação de catalase positiva, indicando a produção dessa enzima.

O peróxido de hidrogênio a 30% também pode ser utilizado para essa prova. Pingue uma gota da solução sobre uma colônia suspeita e observe a reação. Quando ocorre a formação de bolhas, a reação é positiva.

Como fazer a prova de oxidase? (Etapa D do fluxograma)

Existem dois reagentes que podem ser utilizados para essa reação. O primeiro pode ser preparado segundo Kovacs e consiste na formulação de uma solução aquosa a 1% de tetrametil - p - fenilenodiamina. O segundo, de acordo com Gordon e Mcleod, consiste no preparo de uma solução aquosa a 1,5% de dimetil - p - fenilenodiamina.

Você poderá fazer a reação de oxidase colocando o reativo diretamente sobre a colônia, na placa de cultivo, ou preparando previamente uma fita de oxidase. Se você utilizar o reativo em solução sobre a colônia, este deverá ser preparado no momento do uso, não podendo ser estocado. Se você preferir utilizar as fitas reativas de oxidase, veja como prepará-las em *Preparo dos* meios. Para realizar a reação da oxidase, pegue uma colônia suspeita e esfregue-a sobre a fita.

Uma cor rosa, chegando até púrpura, aparecerá rapidamente, entre 10 a 20 segundos, nas reações de oxidase positiva, quando o reagente utilizado for o dimetil-p-fenilenodiamina. Uma cor violeta surgirá quando for utilizado o tetrametil-p-fenilenodiamina,

Se a reação for negativa, a coloração do reagente no papel de filtro permanecerá inalterada. Para maior praticidade, existem fitas de oxidase, prontas para uso, disponíveis no mercado. A *Neisseria gonorrhoeae* caracteriza-se por apresentar reação de oxidade **positiva.**

Quais os fatores que interferem no resultado da prova da oxidase?

A utilização de alças ou fios metálicos, tais como níquel-cromo e platina, podem provocar reações falso-positivas. É importante reforçar que a prova de oxidase deve ser feita sempre após a coloração de Gram, pois alguns bacilos gram-negativos são positivos na reação de oxidase e podem produzir colônias semelhantes às da *Neisseria gonorrhoeae,* principalmente quando o meio de Thayer Martin modificado tem mais de 10 dias de preparo, Nesta fase do procedimento de identificação, se as provas forem positivas, você terá terminado a identificação presuntiva.

Como realizar a identificação confirmatória?

Se a reação de oxidase for positiva, você deverá repicar a cepa em meio não seletivo (ágar chocolate enriquecido) - etapa E do fluxograma. A partir do subcultivo, você vai fazer a reação de degradação dos carboidratos (açúcares),

Como fazer a prova de degradação dos carboidratos (açúcares)?

Prepare uma suspensão densa da bactéria em solução salina 0,85%, utilizando o crescimento de uma subcultura pura, obtida a partir do meio de isolamento não seletivo (ágar chocolate enriquecido) com crescimento de 18 horas. Pingue de duas a três gotas em cada um dos tubos de CTA, contendo1 de cada um dos açúcares (glicose, maltose e sacarose, respectivamente). Misture a solução no terço superior do meio com alça bacteriológica. Incube entre 35,5 e 36,5ºC por 24, 48 e 72 horas, sem atmosfera de CO2.

Examine os tubos de fermentação de açúcares a cada 24 horas de incubação. Caso haja acidificação do meio, o indicador (vermelho de fenol) mudará a cor do meio de vermelho alaranjado para amarelo. A prova será positiva para *Neisseria gonorrhoeae,* apenas quando a glicose for o único carboidrato metabolizado, como pode ser visto na tabela,

Resultados da prova de degradação dos carboidratos

Espécime	Glicose	Maltose	Lactose	Sacaraose	ONPG
N. gonorrhoeae	+	-	-	-	
N. meningitidis	+	+	-	-	-
N. lactamica	+	+	+	-	-
N. cinérea	-	-	-	-	-
N. polysaccharea	+	+	-	-	-
N. subflava	+	+	-	V	-
N. sicca	+	+	-	+	-
N. mucosa	+	+	-	+	-
N. flavescens	-	-	-	-	-
N. elongata	-	-	-	-	-

Que outros métodos existem para a identificação confirmatória da Neisseria gonorrhoeae?

Existem vários métodos disponíveis no mercado. Dentre eles, os mais utilizados são o sistema Quad Ferm+TM, Minitek e Bactek. Métodos Imunológicos baseados na reação com a proteína I do Gonococo também estão disponíveis no mercado internacional e são apresentados em vários formatos. Os mais conhecidos são o Gonogen, Gonogen II, PHADEBACT MONOCLONAL GC e o MINITEK - TM.

Embora práticos, os testes acima mencionados são, via de regra, importados e custam caro.

Como saber se uma cepa de gonococo é sensível à penicilina?

Você deve fazer a pesquisa de ß-lactamase.

O que é ß -lactamase ou penicilinase?

ß-lactamase ou penicilinase é uma enzima inativadora da penicilina. A penicilina ainda é o antibiótico de primeira escolha para o tratamento da gonorréia no Brasil. Esta enzima, na *Neisseria gonorrhoeae,* é sintetizada no espaço periplasmático da parece celular. Sua produção é mediada por um plasmídio (material genético extracromossômico) - figura 2.

A ß-lactamase destrói a ligação amida dentro do anel ß-lactâmico da penicilina, produzindo ácido penicilinóico. Como o anel ß -lactâmico da penicilina é responsável pela atividade deste antibiótico, a hidrólise deste anel causa a perda de sua atividade - figura 3.

No espaço periplasmático, entre a proteína alvo, na membrana interna e a membrama externa da parede celular, a) ß-lactamase, por mecanismo de competição, liga-se à penicilina, inativando-a - figura 4.

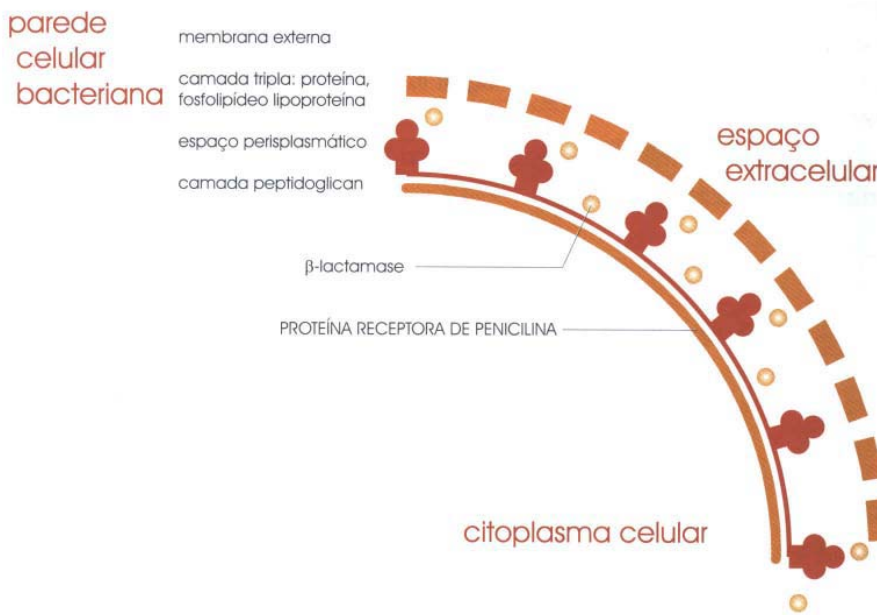


Figura 2. representação esquemática do envelope celular de bactérias gram-negativas

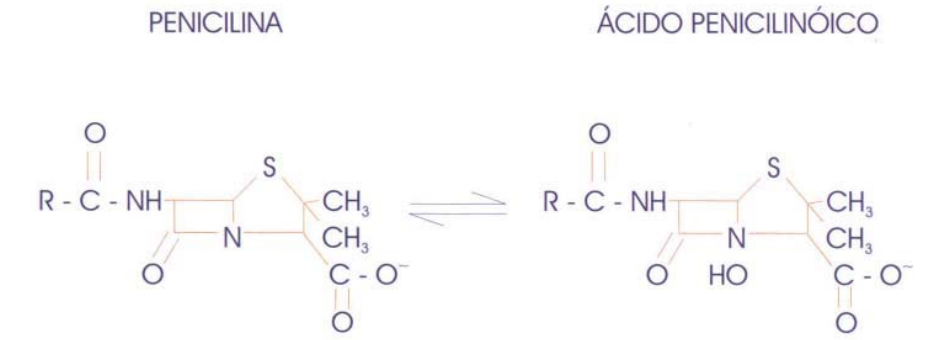


Figura 3 ação bioquímica da penicilinase sobre a penicilina.

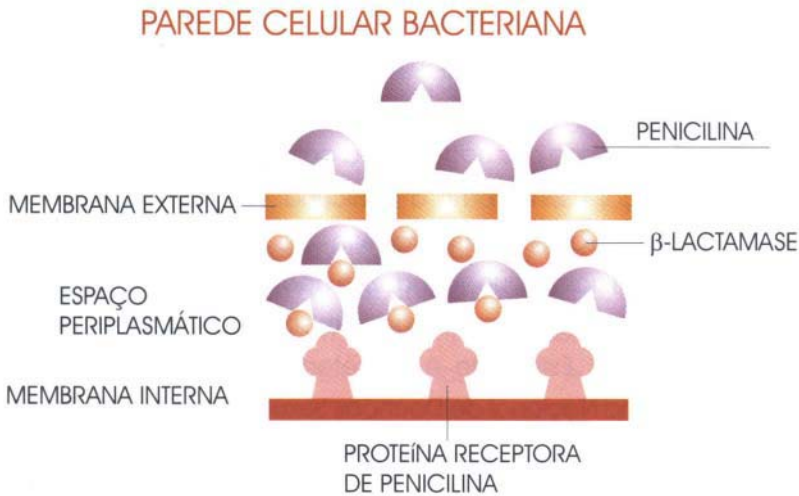


Figura 4: mecanismo de ação da ß-lactamase, hidrólise e ligação da ß-lactamase ao anel ß-lactâmico de antibiótico.

Quais os métodos disponíveis para a detecção da enzima β-lactamase ou penicilinase?

Existem três métodos disponíveis:

1. método acidométrico: é composto por uma penicilina como substrato e um corante indicador de pH. Quando a penicilinase está presente, ela hidroliza o anel β-lactâmico da penicilina, formando ácido penicilinóico, que acidifica o meio, mudando a cor do corante indicador de cor;

2. método iodométrico: é composto por uma mistura de amido e penicilina e revelado por uma solução de iodo. O iodo, quando em contato com o amido, forma uma coloração negro-azulada. Quando a penicilinase está presente, ela hidroliza o anel β-lactâmico da penicilina, formando ácido penicilinóico, que acidifica o meio, desnaturando o amido e evidenciando um halo esbranquiçado em volta do material testado (colônia suspeita); e

3. método da cefalosporina cromogênica: a cefalosporina cromogênica é um antibiótico β-lactâmico, assim como a penicilina. Quando a penicilinase está presente, ela hidroliza o anel β-lactâmico da cefalospina cromogênica, formando também um ácido, que vai induzir o aparecimento de uma coloração avermelhada. Esta prova pode ser realizada em solução líquida, em fita ou disco previamente preparado. Este teste é o método indicado como padrão de trabalho pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Ministério da Saúde.

Como fazer a prova da cefalosporina cromogênica?

A cefalosporina cromogênica pode ser adquirida comercialmente sob várias apresentações: soluções líquidas, discos e fitas. Independente da apresentação, a realização do teste consiste basicamente na mistura da cepa bacteriana com a cefalosporina. A reação positiva, indicada pelo desenvolvimento de coloração rosa no material, ocorre geralmente dentro de 5 minutos, porém, às vezes, pode levar até 1 hora para se desenvolver.

Como estocar cepas de Neisseria gonorrhoeae para futuros estudos de sensibilidade aos antibióticos?

Existem vários métodos para a manutenção de cepas bacterianas por longos períodos. A liofilização, o congelamento a -70°C em papel de filtro, ou tubos e outros.

O PN-DST/AIDS recomenda a estocagem em tubos, por congelamento a -70°C. Para assegurar a viabilidade de sua cepa, proceda como descrito a seguir:

1. pegue um tubo para congelamento (criotubo) estéril de 1,8 ml;
2. prepare uma solução densa de suspensão bacteriana, pela adição de várias colônias em 1,0 ml de BHI com glicerol (vide Preparo dos meios). Utilize um subcultivo recente, com 18 horas de incubação e tome cerca de 1/3 das colônias crescidas; e
3. congele imediatamente a - 70°C. Essa suspensão pode ser descongelada para a remoção de uma pequena alíquota e recongelada a seguir, desde que a suspensão inicial seja bastante densa.

Neisseria gonorrhoeae

CONTROLE DE QUALIDADE

CONTROLE DE QUALIDADE

Como fazer o controle de qualidade dos meios de transporte, cultura e identificação da Neisseria gonorrhoeae?

Você vai fazer o controle de qualidade, lote a lote, de todos os meios e reagentes usando cepas-padrão. O controle de qualidade deve ser feito a cada novo lote de meio preparado ou adquirido e sempre antes de iniciar a testagem das amostras da rotina diária. Veja na tabela quais as cepas-padrão que você deverá utilizar e que resultados você deverá obter.

Meios/reagentes	Cepas-padrão	Resultado esperado
Meios de Transporte de Amies	*Neisseria gonorrhoeae* WHO A, B, C, D e E ATCC 49. 226 e 29.213	Recuperação da bactéria quando semeado em melo e TMm
Meio de ThayerMarttin modificado	*Neisseria gonorrhoeae* WHO A, B, C, D, e E ATCC 49. 226 e 29.213	Crescimento POSITIVO
	Escherichial coll TCC25.922	Crescimento NEGATIVO
Cystina Tryptyicase Ágar - CTA	*Neisseria gonorrhoeae* WHO A, B, C, D e E ATCC 49.226 e 29.213	Acidifica apenas a glicose
	Nenisseria meningitidis ATCC 13.102	Acidifica a glicose e a maltose
Reação de catalase	Staphylococcus aureus ATCC 25.923 Streptococcus pyogenes ATCC 19.615 Escherichia coll ATCC 25.922	POSITIVA NEGATIVA NEGATIVA
Pesquisa de β-lactamase ou penicilinase	*Neiseriria gonorrhoeae* WHO A e E	Cepa WHO A – NEGATIVA Cepa WHO E - POSITIVA

Como fazer o controle da qualidade dos meios e reagentes?

Com o auxílio de um swab, pegue uma ou duas colônias de uma das cepas descritas no quadro e inocule no meio de transporte de Amies. Após 4 horas, semeie em meio de Thayer Martin modificado (veja técnicas de semeadura no curso TELELAB - *Técnicas para coleta de secreções)*. Após 48 horas de incubação em condições apropriadas, confira o crescimento da *Neisseria gonorrhoeae*. Caso esse seja positivo, significa que o lote do meio de Amies possui a qualidade desejada.

Para o meio de Thayer Martin modificado, utilize as cepas descritas no quadro e, após 48 horas de incubação em condições apropriadas, confira a condição de crescimento, também descrita no quadro.

Para o teste de degradação de açúcares, utilize as cepas descritas no quadro e após 24, 48 e 72 horas de incubação em condições apropriadas, confira a condição de acidificação dos açúcares.

Para os demais testes, utilize as cepas indicadas no quadro, realizando os testes conforme as técnicas descritas nesse manual.

Sempre que os resultados forem os descritos no quadro, seus meios e reagentes estarão adequados para uso.

Neisseria gonorrhoeae

PREPARO DOS MEIOS

PREPARO DOS MEIOS

Meio de Amies

Esse meio pode ser adquirido comercialmente na forma desidratada ou preparado em seu laboratório.

Caso você adquira o produto comercialmente, siga as instruções do fabricante, Caso você opte pelo preparo, pese separadamente os seguintes componentes:

tioglicolato de sódio _____ 1,00g
carvão farmacêutico neutro _____ 10,0g
cloreto de sódio (NaCl) _____ 3,00 g
fosfato de sódio dibásico (Na, HPO_4) _____ 1,15g
fosfato de potássio monobásico (KR, PO,) __ 0,20 g
cloreto de potássio (KCl) _____ 0,20 g
cloreto de cálcio (CaCl, $2H_2O$) _____ 0,10 g
cloreto de magnésio ($MgCl_2$ $6H_2O$) _____ 0,10 g
ágar _____ 3,60 g
água destilada _____ 1000ml

Dissolva os componentes na água destilada. Esse meio pode ser aquecido até o ponto de fervura. O importante é que todos os componentes estejam completamente dissolvidos. Ajuste o pH em 7,4±0,2. Autoclave por 15 minutos a 121°C. Distribua 2 ml em tubos de vidro estéreis com tampa rosqueável. Estes tubos podem ser guardados em geladeira no máximo por um mês.

Lembre-se de que o meio de Amies proporciona um percentual alto de culturas positivas de *Neisseria gonorrhoeae* em relação a outros sistemas de transporte. Entretanto, é recomendado para trânsito de curto período, até 8 horas.

Meio de Thayer-Martin modificado

Esse meio é preparado em quatro etapas. Para o seu preparo, confira se você dispõe dos seguintes componentes:

meio base GC _____ 36,00 g
hemoglobina bovina_____ 10,00 g
suplemento VX (ou de Kellogg's)_____ 10,00 ml
VCNT (vancomicina 3,00 ml, colistina 7,5 ml, nistatina 12,5 ml e trimetroprima 5,0 ml)
água destilada _____ 1 litro

Etapa 1

Em um balão de fundo chato, coloque 500 ml de água destilada. Adicione 36 gramas de meio base GC. Aqueça sob agitação constante em chama de bico de Bunsen ou de fogão a gás, até a completa dissolução do meio. Evite que a mistura atinja o ponto de fervura. Autoclave por 15 minutos a 121°C.

Etapa 2

Em outro balão de fundo chato, dissolva 10,00g de hemoglobina em 500 ml de água destilada. Aqueça sob agitação constante em chama de bico de Bunsen ou de fogão a gás, até a completa dissolução. Autoclave por 15 minutos a 121°C.

Etapa 3

Em banho-maria ajustado em 45±5°C, aqueça as misturas produzidas nas etapas 1 e 2 até que o ágar esteja completamente fundido. Assepticamente, misture o conteúdo dos dois balões e homogeneíze.

Etapa 4

Em capela de fluxo laminar, pegue a mistura da etapa 3.
Assegure-se de que esta esteja em temperatura de 45±5°C.
Adicione os 10 ml de suplemento VX e os antibióticos que compõe o VCNT nas concentrações definidas. Homogeneíze bem. Distribua, assepticamente, cerca de 25 ml do meio em placas de Petri. Deixe solidificar (15 a 20 minutos). Acondicione em sacos plásticos. Estoque em geladeira a 4°C por 10 dias. Após esse período, os meios começam a sofrer desidratação e os antibióticos apresentam declínio de sua ação inibidora, diminuindo a seletividade do meio.

Suplemento definido de Kellogg's

glicose _____ 40,00 g
glutamina _____ 1,00 g
solução de nitrato de ferro a 0,5% _____ 10,00 ml
água destilada _____ 90 ml

1. Misture os ingredientes;
2. autoclave por 15 minutos a 120°C;
3. esfrie em banho-maria a 45±5°C;
4. adicione 1 ml de solução estéril de cocarboxilase a 20%; e
5. guarde em frasco estéril de 100 ml com tampa rosqueável a 4°C (estável por vários meses.

Meio para degradação de açúcares

Esse meio é preparado em três etapas.

Etapa 1

ágar cistina tripticase, CTA _____2,90 g
ágar _____0,75 g
água destilada _____95,0 ml

Em um balão de fundo chato de 200 ml, coloque 95,0 ml de água destilada. Adicione 2,9 g do meio CTA e 0,75 g de ágar. Aqueça sob agitação constante em chama de bico de Bunsen ou de fogão a gás até a completa dissolução. Evite que a mistura atinja o ponto de ebulição. Autoclave por 15 minutos a 121°C.
Se você não possuir o meio CTA pronto, ou se preferir, você poderá formular da seguinte maneira:

triptose _____2,00 g
l-cistina _____0,05 g
cloreto de sódio _____0,5 ml
sulfito de sódio _____0,05 g
vermelho de fenol _____ 0,0017 g
ágar _____1,00 g
água destilada _____ 95 ml

Etapa 2

Nesta etapa, você preparará as soluções estéreis dos açúcares. Para o seu preparo, confira se você dispõe dos seguintes componentes:

água destilada _____ 100 ml
glicose _____ 20,0 g
lactose _____ 20,0 g
sacarose _____ 20,0 g
maltose _____ 20,0 g

Coloque 100 ml de água destilada em um balão de fundo chato de 250 ml e adicione 20,0 gramas do açúcar a ser preparado. Agite até a completa dissolução. Esterilize por filtração em membrana de 0,22 µ de diâmetro. Repita o procedimento para todos os açúcares. As soluções estéreis dos açúcares poderão ser guardadas em frascos-ampola lacrados, estéreis, em geladeira (4°C) e poderão ser utilizados por 6 meses.

Se você tiver dificuldades para acondicionar e estocar em condições ideais, diminua o volume para 10 ml (adicionando 2,0 g de cada açúcar para 10 ml de água destilada). Esterilize por filtração, como descrito acima. Utilize o volume necessário e despreze o restante.

Etapa final

Em banho-maria ajustado para 45±5°C, aqueça o meio de CTA preparado na etapa 1, até que o ágar esteja completamente fundido. Assepticamente, acrescente 5 ml da solução do açúcar a 20%, preparado na etapa 2. Misture bem e distribua 4 ml em tubos estéreis de 12 x 120 mm, com tampa rosqueável. Rotule adequadamente e estoque a 4°C, em geladeira por até 30 dias. Descarte antes, se você observar a ocorrência de desidratação. Lembre-se de que esta preparação deverá ser repetida para cada açúcar.

Preparo de fitas para prova de oxidase

Reativo de Kovacs
tetrametil-p-fenilodiamina _____ 0,1 g
água destilada _____ 10 ml

Reativo de Gordon e Mcleod
dimetil-p-fenilodiamina_____ 0,15 g
água destilada _____ 10 ml

Modo de preparo:

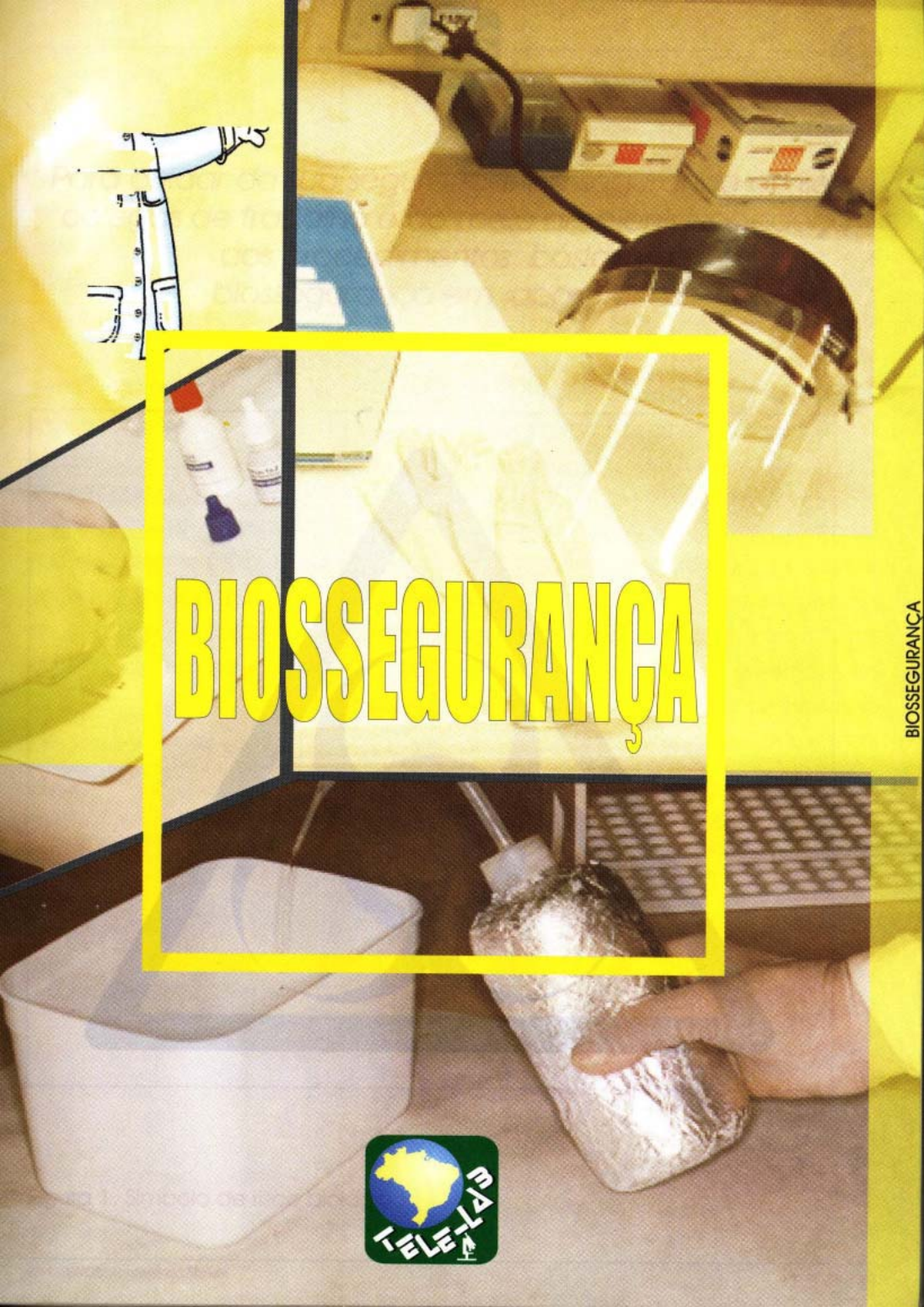
1. corte papel de filtro em tiras de 2 x 1 cm;
2. coloque as tiras em uma placa de Petri;
3. pingue 3 gotas do reagente sobre cada tira;
4. deixe-as secar em estufa a 37°C, mantendo a placa de Petri destampada;
5. guarde as tiras em frasco de vidro escuro, limpo, seco e identificado com o nome do reagente e a data do preparo;
6. guarde em geladeira; e
7. teste a fita diariamente com uma cepa-controle.

Meio de BHI + glicerol para congelamento de cepas

BHI (Brain Heart Infusion Broth) _____ 3,7 g
glicerol _____ 20,00 ml
água destilada _____ 80,00 ml

Modo de preparo:

1. em um balão, misture todos os componentes;
2. autoclave por 15 minutos a 121°C;
3. dispense, assepticamente, 1 ml em tubos para congelamento (criotubos) com tampas rosqueáveis; e
4. estoque a 4°C.



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.

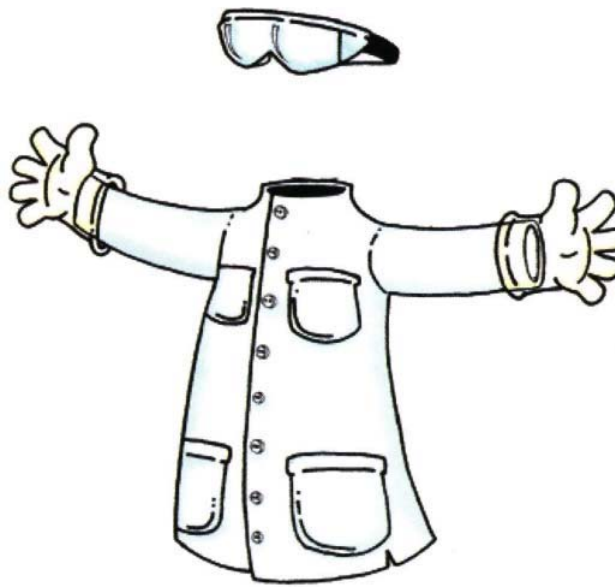


Figura 2. Ilustração dos principais equipamentos de proteção individual (EPI)

Evite a formação e dispersão de aerossóis.

Aerossóis são micropartículas sólidas e líquidas com dimensões aproximadas entre 0,1 e 50 micro 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. Envolva 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.

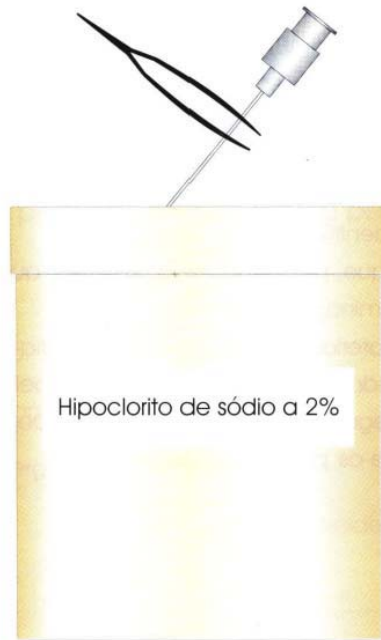


Figura 3. Ilustração do descarte de agulha em recipiente apropriado.

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, fadiga 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.

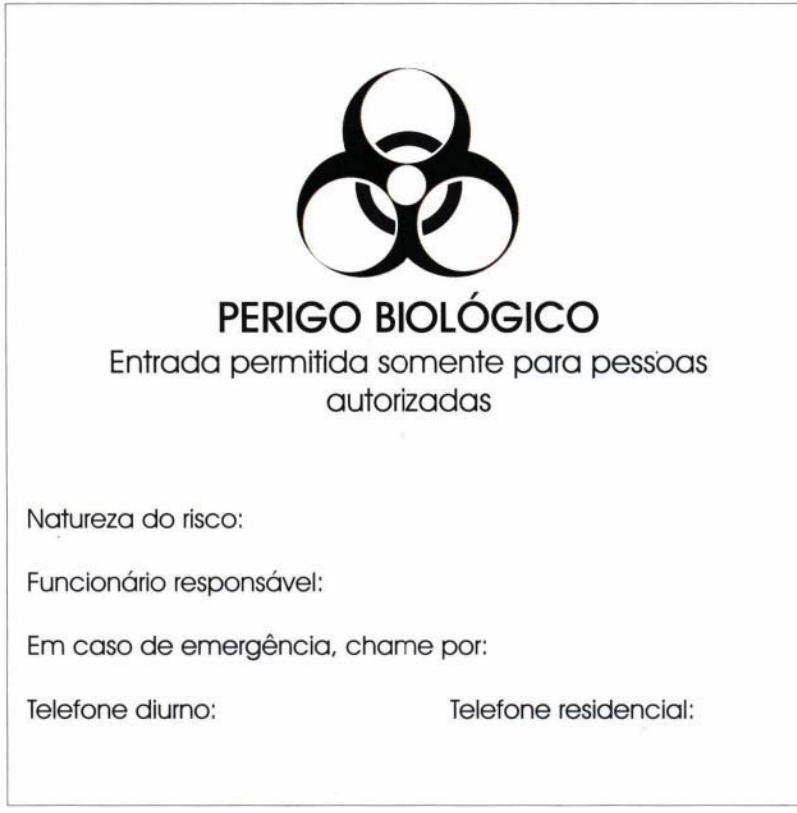


Figura 4. Símbolo de risco biológico para entrada de laboratórios.

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 e um depósito. Evite guardar equipamentos ou quaisquer outros objetos no seu interior.

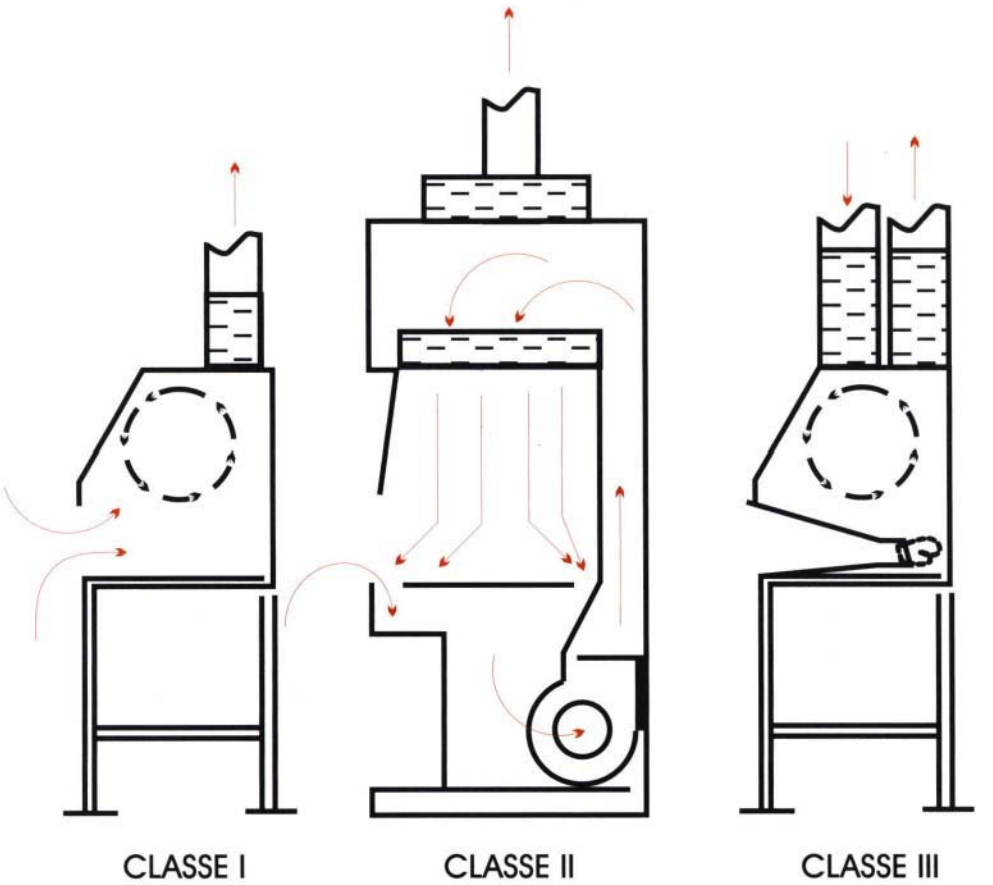


Figura 6 : ilustração das cabines de segurança biológica - classes I, II e III.

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 use para evitar custos excessivos e utilização inadequada.

Para a descontaminação de amostras biológicas na rotina dos laboratórios clínicos, recomendamos os compostos libertadores 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 autoclavação 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:l
  Lava-olhos?
  Chuveiros de emergência?
  Proteções contra radiações, incluindo os dozímetros?
  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 freqüência?
- 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

AARDOOM, H.A.; DEHOOP, D.; ISERIEF, C.O.A.; MICHEL, M.F. & STOLZ, E. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* antigen by a solid-phase rnzime immunoassay. Br. J. Vener. Dis, 58: 359-62, 1982.

DANIELSSON, D. & KRONVALL, G. Slide agglutination method for the serological identification of *N. gonorrhoeae* with antigonococcal antibodies absorbed to protein-A-containing Staphylococci. Appl. Microbiol., 27: 368-74, 1974.

DILON, J, R.; A laboratory course: identification and antimicrobial susceptibility testing for *N. gonorrhoese* WHO/PAHO, coordinating center for gonococcal antimicrobial surveillance program in the Americas and Caribbean, first ed, Ottawa, 1997.

EHRET, J.M.; JUDSON, F.N. & BIDDLE, J.W. Gonorrhea. In: Laboratory Methods for the diagnosis of sexually transmitted diseases. Bettina B. Wentworth & Franklyn N. Judson. American Public Association Washington, D.C. p.44-79,1984.

FAUR, Y.C.; WEISBURD, M.H.; WILSON, M.E. & MAY, P.S.. A new medium for the isolation of pathogenic Neisseria (NYC Medium). 1. Formulation and comparisons with standard media. Health Lab. Sci., 10: 44-54, 1973.

FAUR, Y.C.; WEISBURD, M.H. & WILSON, M.E.. Carbohydrate fermentation plate fo confirmation of Neisseria species. J. Clin. Microbiol., 1:294-7, 1975,

FREUNDLICH, L.F.; ROSENTHAL, S.L.; HOCHBERG, A.A.S. & TROGELE, M.R. Comparison of methods for the immunologic identification of Neisserid gonorrhoeae in clinical specimens using commercially-obtained reagents Am. J. Clin. Pathol., 77: 456-8, 1982

JOHNSTON, N.A., Evaluation of the coagglutination test for the identification G Neisseria gonorrhoeae in primary cultures. Br. J. Verner. Dis.,57: 315-9, 1981.

KILLIAN, M. Haemophilus. In: Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition. Alber Balow, Willian J. Hansler Jr., Kenneth L.Herrmann, Henry D.Isenberg, H. Jear Shadomy. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 463 470, 1991.

MARTIN Jr. J.E.; ARMSTRONG, J.N. & SMITH, P. B. New system for cultivation of Neisseria gonorrhoeae. Appl. Microbiol., 27: 802-5, 1974.

MARTIN, Jr., J.E. & JACKSON, R.L. A biological environment chamber for the culturE of Neisseria gonorrhoeae. J.Am. New. Dis. Anal., 2: 28-30, 1975.

MARTIN Jr, J.E. & LESTER, A. Transgrow, a medium for transport and growth o Neisseria gonorrhoeae and Neisseria menintidis. HSMHA Health Rep., 86: 30

3, 1971.

MARTIN JE, Jr & LEWIS JS. Selective culture screening for penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. Lancet, 2: 605-6, 1977.

MORELLO, J.A.. Neisseria gonorrhoeae: Methods for laboratory identification. Am. J. Med. Technol., 48: 233-8, 1982.

MORELLO, J.A. ET AL. Neisseria and Branhameila. In: Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition. Albert Balows, Willian J.Hausler Jr. Kenneth I L.Hermann, Henry D. Isenberg, H.Jean Shadomy. American Society for Microbiology Washington, D.C. p258-276, 1991

STRAUSS, R.R.; HOLDERBACH, J. & FRIEDMAN, H.. Coparison of radiometric procedure with conventional methods for identification of Neisseria. J. Clin. Microbiol., 7: 419-22, 1978.

Agradecimentos: *Às* Equipes *da:*
Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo;
Ao Laboratório ControlBio, São Paulo; e ao Hospital Universitário - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Vídeo, projeto gráfico, arte final e impressão:

GTEC PRODUÇÃO E VIDEOCOMUNICAÇÃO LTDA.

MIX COMUNICAÇÃO

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