CULTURA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA NEISSERIA GONORRHOEAE

NEISSERIA GONORRHOEAE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

Homenagens e 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.

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 Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

À Dra. Lair Guerra de Macedo Rodrigues, exemplo de coragem e liderança, dedicamos este trabalho.

Mariângela Batista Galvão Simão

Meio de transporte 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).....3,00g

fosfato de sódio dibásico (Na_2 HPO_4).....1,15g

fosfato de potássio monobásico (KH2 PO_4).....0,20g

cloreto de potássio (KCl).....0,20g

cloreto de cálcio ($CaCl_2$ $2H_2O$).....10g

cloreto de magnésio ($MgCl_2 6H_2O$).....0,10g

ágar.....3,60g

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 121ºC. 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 quatros etapas. Para o seu preparo, confira se você dispõe dos seguintes componentes:

meio base GC.....36,00g

hemoglobina bovina.....10,00g

suplemento VX (ou de Kellogg's).....10,00ml

VCNT (vancomicina 3,00ml, colistina 7,5ml, nistatina 12,5ml e trimetroprima 5,0ml)
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 Busen 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 Busen 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 homogeneize.

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 compõem o VCNT, nas concentrações definidas. Homogeneize 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 4ºC 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.....40,00g

Glutamina.....1,00g

Solução de nitrato de ferro a 0,5%.....10,00ml

Água destilada.....90ml

1. Misture os ingredientes;
2. Autoclave por 15 minutos a 120ºC;
3. Esfrie em banho-maria a 45 ± 5ºC;
4. Adicione 1 ml de solução estéril de cocarboxilase a 20%; e
5. Guarde em frasco estéril de 100 ml com tampa rosqueável a 4ºC (estável por vários meses).

Prova da oxidase

Preparo de fitas para a prova de oxidase

reativo de kovacs

tetrametil-p-fenilodiamina.....0,1g

água destilada.....10ml

reativo de Gordon e Mcleod

dimetil-p-fenilodiamina.....0,15g

água destilada.....10ml

Modo de preparo

1. Corte papel de filtro em tiras de 2X1 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 37ºC, 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 para fermentação de açúcares

Etapa 1

ágar cistina tripticase, CTA.....2,90g

ágar.....0,75g

água destilada.....95,0ml

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 Busen ou de fogão a gás até a completa dissolução.

Evite que a mistura atinja o ponto de ebulição. Autoclave por 15 minutos a 121ºC.

Se você não possuir o meio CTA pronto, ou se preferir, você poderá formular da seguinte maneira:

triptose.....2,00g

I-cistina.....0,05g

cloreto de sódio.....0,5ml

sulfito de sódio.....0,05g

vermelho de fenol.....0,0017g

ágar.....1,00g

água destilada.....95ml

Etapa 2

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

água destilada.....100ml

glicose.....20,0g

lactose.....20,0g

sacarose.....20,0g

maltose.....20,0g

Coloque 100 ml de água 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 0,22µ de diâmetro. Repita o procedimento para todos os açúcares. As soluções estéreis dos açúcares poderão ser guardadas em frascos-ampola lacrados, estéreis, em geladeira (4ºC) 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 ± 5ºC, 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 4ºC, 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.

Cuidados no isolamento e identificação

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 30 ml 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 35,5º a - 36,5ºC, 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-DST/AIDS-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 microbiota normal ou não, presentes nos materiais 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 NY (New York City), que diferem entre si pelas substâncias inibidoras utilizadas. O meio recomendado pelo PN-DST/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 de *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 coloraçãode Gram, prova de catalase, prova da oxidase.

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 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 no 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?

As colônias de *Neisseria gonorrhoae* são normalmente pequenas, brilhantes, viscosas e extremamente aderidas ao meio, difíceis de serem retiradas do meio da cultura com o 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 e tonalidade acastanhada. Essas cepas não possuem *pili* e são facilmente removidas do meio com alça bacteriológica.

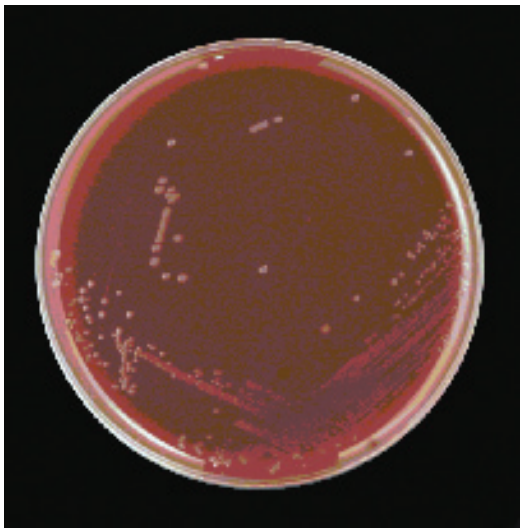


Figura 1: colônias característica de *Neisseria gonorrhoeae.*

Identificação presuntiva

Como fazer a confirmação das características morfotintoriais da Neisseria gonorrhoeae pelo método de Gram?

Após 24 a 48 horas de incubação, verifique o crescimento nas placas de Thayer Martin modificado. Selecione uma colônia suspeita. Pegue esse 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 demostrado no curso TELELAB – Técnica de coloração Gram. Observe, sob microscópio, em objetiva de imersão (100X). O achado de estruturas morfológicas compatíveis com o gênero de *Neisser* (diplococos Gram-negativos riniformes) confirma que a bactéria crescida é uma *Neisseria (Figura 2)*.

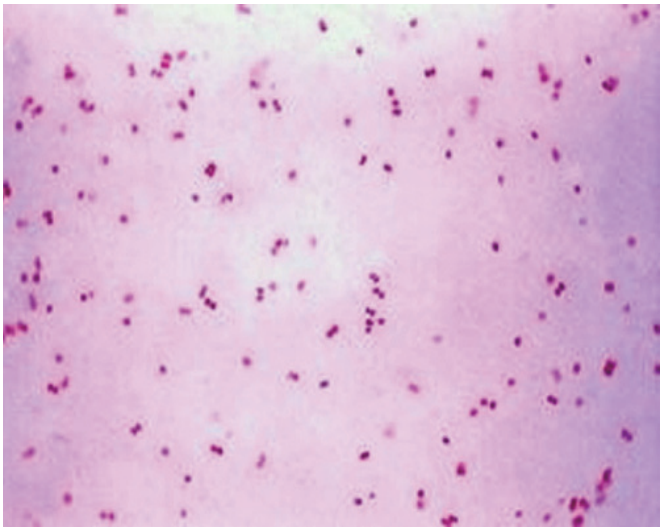


Figura 1: Visualização microscópica em aumento de 100x em lâmina corada por coloração de gram

Como fazer a prova de catalase?

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, pegue uma colônia suspeita do meio de TMm e homogeneize 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 bolhas, a reação é positiva.

Como fazer a prova de oxidase?

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 preparado 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 usar 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-Figura 2.

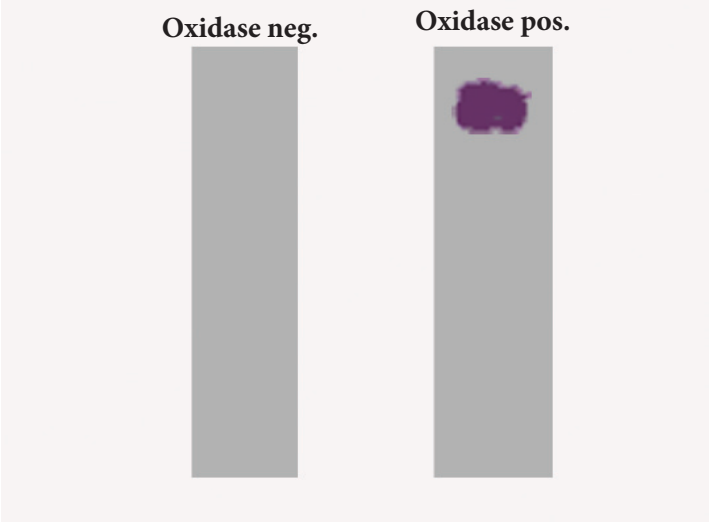


Figura 2: Mostrando a prova de oxidase

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.

Identificação confirmatória

Como realizar a identificação confirmatória?

Se a reação de oxidase for positiva, você deverá repicar a cepa em meio não seletivo (ágar chocolate enriquecido) 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, contendo 1% de cada um dos açúcares (glicose, maltose e sacarose, respectivamente). Misture a solução no terço superior do meio com alça bacteriológica. Incube entre 35,5º e 36,5ºC por 24, 48 e 72 horas, sem atmosfera de CO_2.

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.

Espécime	Glicose	Maltose	Lactose	Sacarose	ONPG
N. gonorrhoeae	+	–	–	–	–
N.meningitidis	+	+	–	–	–
N. lactamica	+	–	+	–	+
N. cinerea	–	–	–	–	–
N. polysaccharea	+	+	–	–	–
N. subflava	+	–	–	V	–
N. sicca	+	–	–	+	–
N. mucosa	+	–	–	+	–
N. flavescens	–	–	–	–	–
N. elongata	–	–	–	–	–

V = VARIÁVEL
– = NÃO FERMENTOU O CARBOIDRATO
+ = FERMENTOU O CARBOIDRATO

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.

Teste de resistência à penicilina

Como saber se uma cepa de gonococo é Produtora de ß-lactamase

Você deve fazer a pesquisa de ß-lactamase.

O que é ß-lactamase ou penicilinase?

ß-lactamase ou penicilinase é uma enzima produzida por algumas cepas de *N. gonorroeae* e outras bactérias e está associada a resistência de algumas drogas antimicrobianas. Esta enzima, na *Neisseria gonorrhoeae*, é sintetizada no espaço periplasmático da parede celular. Sua produção é mediada por um plasmídio (material genético extracromossômico) – figura 1.

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 2.

No espaço periplasmático, entre a proteína-alvo, na membrana interna, e a membrana externa da parede celular, a ß-laclactamase, por mecanismo de competição, liga-se à penicilina, inativando-a — figura 3.

Alguns dos antibacterianos ß-lactâmicos são as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos inibidores de ß-lactamase.

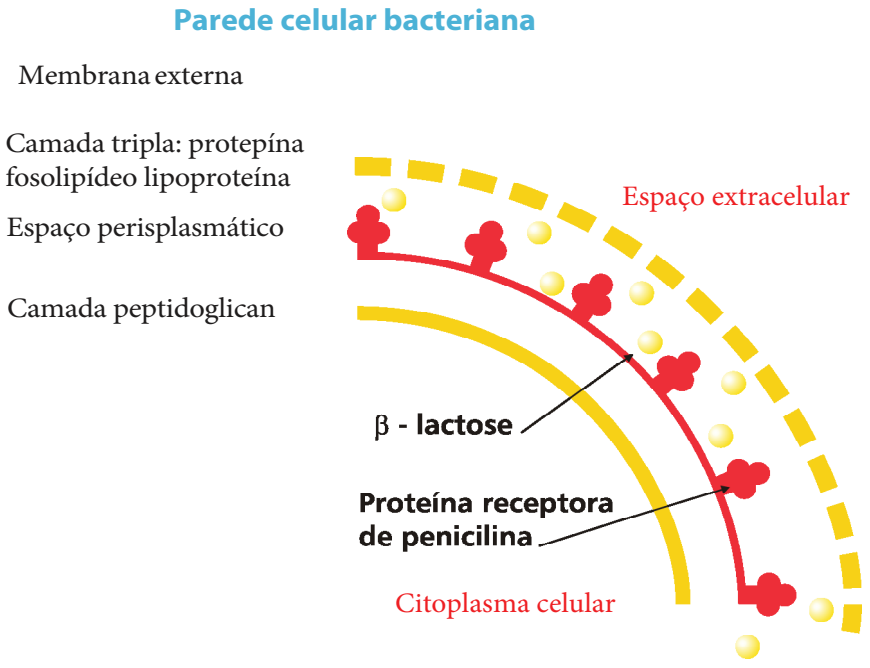


Figura 1: Representação esquemática do envelope celular de bactérias Gam-negativas

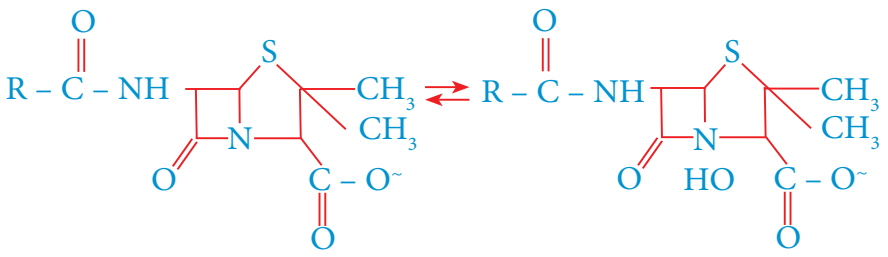


Figura 2: Ação bioquímica da penicilinase sobre a penicilina.

Parede Celular Bacteriana

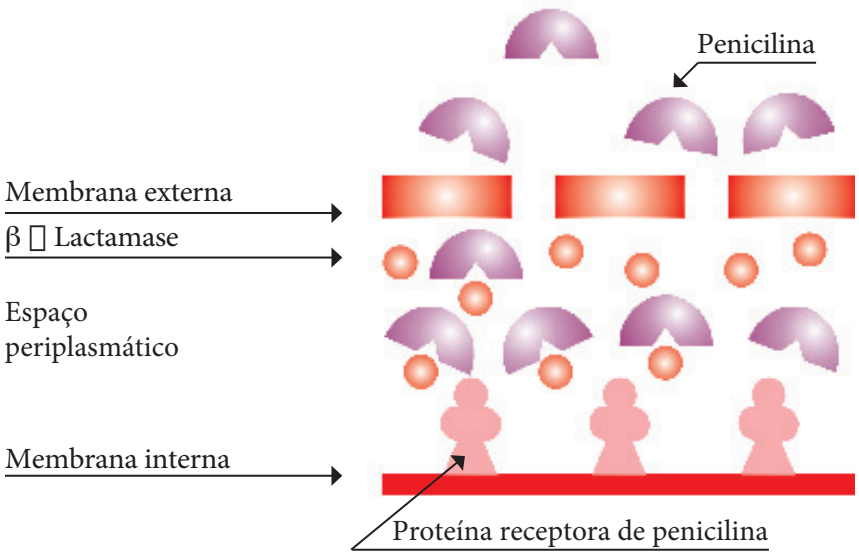


Figura 3: mecanismo de ação da β-lactamase, hidrólise e ligação da β-lactamase ao anel β-lactâmico de antibiótico.

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

Existem alguns métodos disponíveis, dentre eles:

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, formado 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);
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 Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

A cefalosporina cromogênica mais usada é a nitrocefim.

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 por longos períodos. A liofilização, o congelamento a -70ºC em papel de filtro, ou tubos e outros.

O PN-DST/AIDS recomenda a estocagem em tubos, por congelamento a -70ºC. 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 -70ºC. Essa suspensão pode ser descongelada para a remoção de uma pequena alíquota e recongelada a seguir, desde que a suspensão inicial seja bastante densa.

Meio para congelamento de cepas

Meio de BHI + glicerol para congelamento de cepas

BHI (Brain Heart Infusion Broth).....3,7g

glicerol.....20,00ml

água destilada.....80,00ml

Modo de preparo:

1. Em um balão, misture todos os componentes;
2. Autoclave por 15 minutos a 121ºC;
3. Dispense, assepticamente, 1 ml em tubos para congelamento (criotubos) com tampas rosqueáveis;
4. Estoque a 4ºC.

Controle de qualidade de meios e reagentes

Você vai fazer o controle de qualidade, lote a lote, de todos os meios 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 os 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 meio de TMm
Meio de Thayer Martin modificado	*Neisseria gonorrhoeae* WHO A, B, C, D e E ATCC 49.226 e 29.213	Crescimento POSITIVO
	Escherichia coli ATCC 25.922	Crescimento NEGATIVO
Cystina Tryptyicase Ágar - CTA	*Neisseria gonorrhoeae* WHO A, B, C, D e E ATCC 49.226 e 29.231	Acidifica apenas a glicose
	Neisseria meningitidis ATCC 13.102	Acidifica a glicose e a maltose
Reação de catalase	*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19.615 *Escherichiacoli* ATCC 25.922	POSITIVA NEGATIVA NEGATIVA
Pesquisa de β-catalase e ou penicilinase	*Neisseria gonorrhoeae* WHO A e E	Cepa WHO A - Negativa Cepa WHO E - Positiva

Como fazer o controle da qualidade dos meios e reagentes?

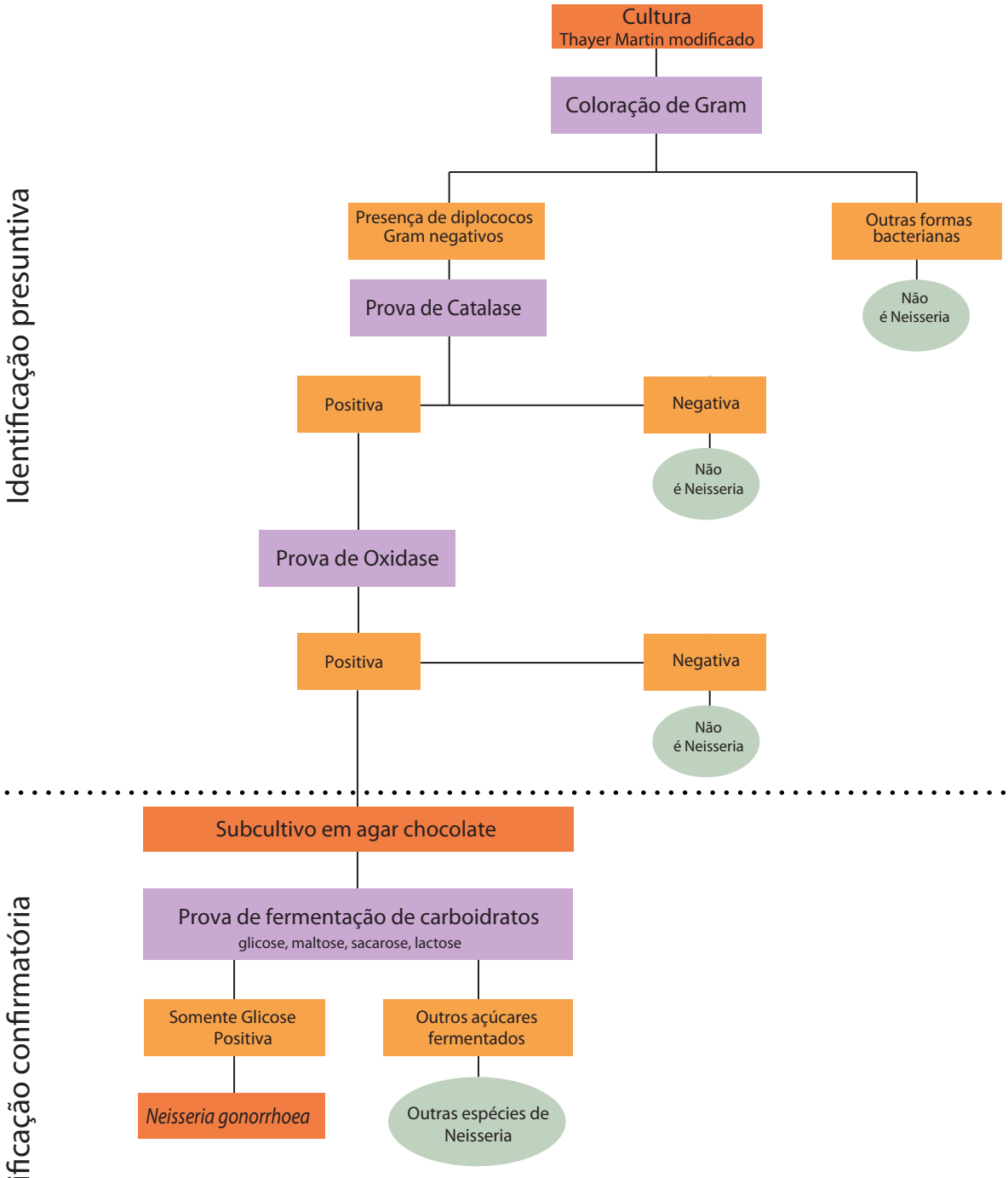
Com o auxílio de um swab, pegue uma ou duas colônias de uma das cepas descritas no quadro e inocule no meio de transporte de Amies. Após 4 horas, semeie em meio de Thayer Martin modificado. Após 48 horas de incubação em condições apropriadas, confira o crescimento da *Neisseria gonorrhoeae*. Caso esse 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 o 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.

Fluxograma para cultura, isolamento e identificação de *Neisseria gonorrhoeae*



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 enzime 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 laborator y course: identification and antimicrobial susceptibility testing for *N. gonorrhoeae* WHO/ PAHO, coordinating center for gonococcal antimicrobial surveillance programa in the Americas and Caribbean, first ed, Ottawa, 1997.

EHRET, J.M., JUDSON, F.N. & BIDDLE, J.W. Gonorrhea. In: Laboratory Metthods for the diagnosis of sexually transmitted diseases. Berttina B. Wentworth & Frankyn N. Judson. American Public association Washington, D.C.p.44-79,1984.

FFAUR,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 for 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 immunocologic identification of *Neisseria 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 of *Neisseria gonorrhoeae* in primary Cultures. Br. J. Verner. Dis.,57:315-9, 1981. KILLIAN, M. Haemmophilus. In: Manual of Clinical Microbiology, Fiffh Edition. Albert Balow, Willian Jr. Hansler Kennetf L.Herrmann, Henry D.Isenberg, H. Jean Shadomy. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 463-470, 1991.

MARTIN Jr. J.E., ARMSTRONG, J.H. & 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 growt of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria menintidis*. HSMHA Health Rep., 86:30-3, 1971.

MARTIN JE, Jr & LEWIS JS. Selective Culture screening for penicilinase- producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet, 2: 605-6,1997.

MORELLO, J. A. *Neisseria gonorrhoeae*: Metthods for laborator y identification. Am. J. Med. Technol., 48:233-8, 1982.

MORELLO, J.A. ET AL. *Neisseria* and Branhamella. In: Manual of Clinica Microbiology, Fiffh Edition. Albert Balows, Willian J. Hauster Jr., Kenneth 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. Comparison of radiometric Procedure with conventional methods for for identification of Neisseria. J. Clin. Microbiol., 7:419-22, 1978.

Créditos e autoria

MINISTÉRIO DA SAÚDE

José Gomes Temporão
Ministro de Estado da Saúde

Gerson Oliveira Penna
Secretário de Políticas de Saúde

Mariângela Batista Galvão Simão
Diretora do Programa Nacional de DST/AIDS-MS

Lilian Amaral Inocêncio
Assessora Técnica da Unidade de Laboratório do PN DST/AIDS-MS

Mirian Franchini
Coordenadora de Produção do Projeto TELELAB

Simone Monzani Vivaldini
Cláudia Beatriz Oliveira
Coordenadoras do TELELAB - Revisão

Autores:

Cláudia Renata Fernandes Martins
José Antônio Pinto de Sá Ferreira
Luis Fernando de Góes Siqueira
Luís Alberto Peregrino Ferreira
Maria Luíza Bazzo
Miriam Franchini
Oscar Jorge Berro
Sílvio Valle

Assessoria Pedagógica:

Maria Lúcia Ricciotti Ribinik
Martistela Arantes Marteleto

Cultura, isolamento e identificação da *Neisseria gonorrhoeae*. - Brasília: Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 1997.

68 p.: il. (série TELELAB)
I.*Neisseria gonorrhoeae* I. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (Brasil). II. Série TELELAB