

1 TERMINOLOGIA E DEFINIÇÃO

a) Repique por esgotamento

Tem por objetivo a obtenção de colônias isoladas. É importante não cruzar as estrias (não tocar a alça na estria anterior), para reduzir o inóculo a cada estria e obter as colônias isoladas. Pode-se, alternativamente, trocar a alça (ou flambar, se estiver utilizando uma alça de platina) entre as estrias e tocar a ponta da estria anterior, arrastando um pequeno inóculo para a próxima estria.

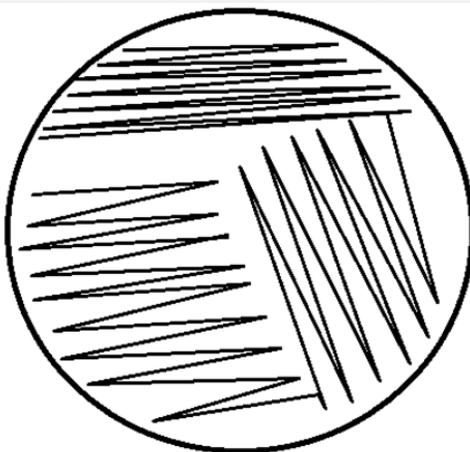


Figura 1 - Semeadura pela técnica do esgotamento

b) Repique quantitativo

Tem por objetivo obter um maior crescimento bacteriano, após prévio isolamento, para ser utilizada em outros ensaios (congelar o isolado, testes de sensibilidade aos antimicrobianos, identificação).

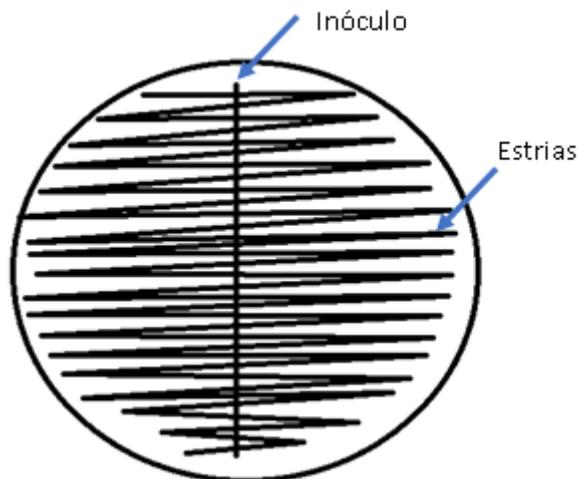
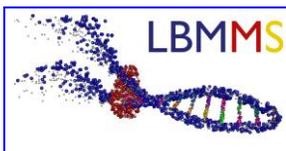


Figura 2 - Semeadura pela técnica quantitativa.



2 DESCRIÇÃO

2.1 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E INSUMOS

- a) Sempre manusear os isolados na bancada próximo ao bico de Bunsen ou dentro da capela de segurança biológica, evitando assim, possíveis contaminações.
- b) Antes de iniciar o procedimento, higienizar a bancada de trabalho com álcool 70% (quando for manusear próximo ao bico de Bunsen). Se for trabalhar na capela de segurança biológica, seguir as instruções de trabalho do equipamento.
- c) Retirar os meios ágar chocolate e Thayer-Martin da geladeira e deixar atingir a temperatura ambiente. Importante: As placas não podem estar com água de condensação no ágar, com contaminação (fungos, colônias bacterianas) ou com o meio desidratado (ressecado).

2.2 CULTURA A PARTIR DE SWAB AMIES

- a) Retirar o Thayer-Martin da geladeira e deixar atingir a temperatura ambiente;
- b) Identificar as placas conforme codificação do serviço;
- c) Preencher o Formulário do Projeto SenGono referente ao seu serviço
- d) Utilizar o próprio *swab* do meio Amies para fazer a sementeira, pela técnica do esgotamento, semeando em ágar Thayer-Martin.
- e) Incubar a amostra de acordo com o item 2.3.

2.3 INCUBAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS

- a) Incubar as placas a temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em ambiente úmido enriquecido com 5% de CO_2 (incubadora/estufa) por até 24h.
- b) Caso não tenha crescimento em 24h, incubar novamente por 48h e 72h.
Em locais que não têm disponibilidade de incubadora, os isolados podem ser incubados em jarra de anaerobiose com vela ou geradores comerciais de CO_2 e o ambiente úmido pode ser obtido com adição de gaze úmida no fundo da jarra.

2.4 OBSERVAÇÃO DAS COLÔNIAS

- a) Após o crescimento, devem ser observadas colônias características de *N. gonorrhoeae*, que normalmente são pequenas, brilhantes e viscosas (Figura 3).

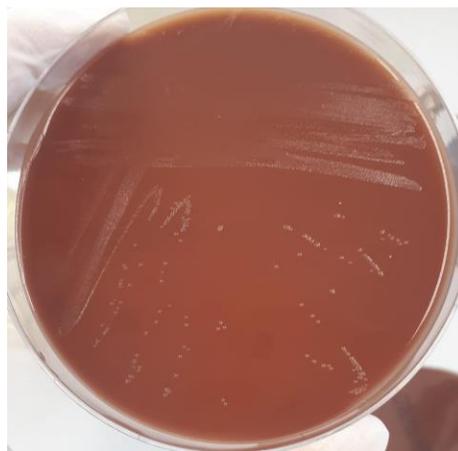
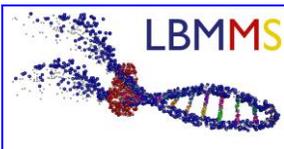


Figura 3 - Colônias características de *N. gonorrhoeae* após repique pela técnica de esgotamento.

- b) Para confirmação do gênero *Neisseria* spp., realizar a bacterioscopia pela coloração de Gram conforme a instrução rápida: Coloração de Gram. Os isolados característicos de *N. gonorrhoeae* são diplococos gram negativos (DGN).
- c) Quando houver crescimento homogêneo, com apenas um tipo de colônia (crescimento puro) realizar o repique para obtenção de cultura de 24h, para posterior armazenamento da bactéria.
- d) Quando houver crescimento de mais um tipo de colônia, deve-se realizar o isolamento para posterior repique (realizar a coloração de Gram para ambas as colônias).

2.5 ISOLAMENTO

2.5.1 Isolamento direto do meio de cultura

Realizado nos casos que é possível a visualização de colônias isoladas características de *N. gonorrhoeae* (Figura 4).



Figura 4 – Placa de ágar chocolate com contaminação.

- a) Deve-se selecionar e retirar a colônia característica de *N. gonorrhoeae* (após confirmação pela coloração de gram) com auxílio de uma alça bacteriológica (agulha) ou alça de 1 μ L e repicar a colônia por esgotamento (Figura 2) em meio Thayer-Martin.

Observação: Sempre dar preferência para fazer o isolamento em meio ágar Thayer-Martin.

Nos casos em que as colônias características de *N. gonorrhoeae* não estão puras, com um maior nível de contaminação, sugere-se o isolamento por diluição.

2.5.2 Isolamento por diluição

- Com uma alça bacteriológica descartável/estéril, retirar **uma** colônia característica de *N. gonorrhoeae* da placa.
- Adicionar a colônia bacteriana em um tubo contendo 2 mL de salina estéril.
- Homogeneizar com auxílio da alça bacteriológica.
- Descartar a alça e utilizar uma alça descartável/estéril para estriar por esgotamento o *pool* bacteriano em meio Thayer-Martin.
- Incubar a 35°C \pm 1°C em ambiente úmido enriquecido com 5% de CO₂ por 24-48h.
- Fazer coloração de Gram para confirmar o crescimento de colônias características de *N. gonorrhoeae*.

Caso ainda tenha contaminação, repetir o procedimento até ter a obtenção de colônias características de *N. gonorrhoeae*. Caso não seja possível o isolamento de *N. gonorrhoeae*, desprezar a placa.

2.6 REPIQUE

O repique é sempre realizado em ágar chocolate.

- Com auxílio de uma alça bacteriológica estéril, selecionar uma colônia pura de *N. gonorrhoeae*;
- Semear por método quantitativo na placa de ágar chocolate para obtenção de crescimento semelhante ao da figura 5.
- Incubar a $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ em ambiente úmido enriquecido com 5% de CO_2 por no máximo 24h (idealmente 20h) ou em jarra de anaerobiose para posterior congelamento e armazenamento dos isolados.



Figura 5 - Colônias características de *N. gonorrhoeae* pelo repique quantitativo.

Observação: Seguir para armazenamento das colônias conforme instrução rápida “Congelamento e armazenamento de isolados de *Neisseria gonorrhoeae*_Sítios Sentinelas”