



PROTOCOLO LABORATORIAL - MENINGITES BACTERIANAS

Atualizado em maio de 2013

Acondicionamento, transporte e manuseio de cepas de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* ao Instituto Adolfo Lutz

As bactérias, em especial as dos gêneros *Haemophilus*, *Neisseria* e *Streptococcus*, são exigentes para o seu crescimento em cultura e são sensíveis às condições ambientais (temperatura, dessecação e outros), portanto é necessário tomar cuidado quanto ao seu acondicionamento, transporte, manuseio evitando-se contaminação e morte das bactérias.

1. Manuseio

O manuseio das culturas deve obedecer às normas internacionais de biossegurança. As bactérias são consideradas de risco II e devem ser trabalhadas em laboratório NB2, em cabines de segurança biológica e uso obrigatório de EPIs (luva, máscara e avental). As cabines de segurança devem estar com a manutenção em dia.

As bactérias mantêm sua viabilidade em meios de cultura adequados e temperatura ambiente por um curto período de tempo - *Neisseria meningitidis* por 3 a 4 dias, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* por 4 a 5 dias. Portanto, as culturas devem ser repicadas após este período ou mantidas congeladas. Os meios de cultura mais utilizados são: ágar sangue de carneiro ou ágar chocolate para *S. pneumoniae*; ágar chocolate, ágar Muller-Hinton ou ágar BHI para *N. meningitidis* e ágar chocolate para *H. influenzae*.

2. Manutenção

A melhor forma de garantir a viabilidade da cultura durante um período curto de armazenamento é o crescimento em meios de cultura sólidos em tubo de rosca inclinado em temperatura ambiente. Culturas em caldo não devem ser utilizadas, pois facilitam a contaminação e diminuem a viabilidade da cultura. O melhor modo de manter a viabilidade da cepa isolada por período prolongado é liofilizar ou congelar. Para o congelamento pode-se utilizar leite desnatado a 10% ou caldo com glicerol estéril, pode-se manter a -70 °C ou a -120 °C (nitrogênio) e pode-se também congelar a -20 °C, porém é esperado perda de viabilidade em 3 a 6 meses.

3. Transporte

A cultura bacteriana deve ser transportada em meio de cultura sólido adequado a cada espécie. Pode-se utilizar também meios de transporte como o meio de AMIES com carvão, pois mantêm a viabilidade bacteriana por uma semana. Não esquecer que as cepas devem ser transportadas em repique recente, isto é, com crescimento de 18 a 24 horas. Nunca transportar as cepas congeladas no sangue, caldo de cultura ou leite.



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

A cultura deve ser transportada sem refrigeração e o empacotamento deve seguir as normas indicadas no "Manual de Biossegurança de Laboratório" (OMS, Genebra, 1987) e as recomendações da IATA quando o transporte for aéreo. Em resumo, os frascos com cepas liofilizadas ou os tubos com as culturas devem ser envoltos em papel absorvente, seguido de saco plástico, e colocados em recipiente de metal, que por sua vez deve ser colocado no recipiente de transporte de papelão. No recipiente de transporte deve-se colocar uma etiqueta com o endereço e a advertência de que se trata de agente biológico. O papel absorvente que envolve os frascos ou tubos deve ser suficiente para absorver o conteúdo completo do frasco, caso o tubo ou frasco se rompa. Não se deve transportar mais que 50 ml de cultivo em cada pacote. Toda cepa deve ser transportada acompanhada da identificação da cepa no laboratório de origem (número da cepa, data, endereço e telefone do laboratório de isolamento, cidade, etc.) e dos dados demográficos do paciente (nome, idade, suspeita clínica, material clínico de isolamento, cidade de residência, medicação, etc.).

OBSERVAÇÕES

- O isolamento do agente etiológico pela cultura é fundamental para a vigilância epidemiológica, pois é o exame considerado padrão ouro, pois permite a caracterização final do agente (caracterização antigênica, genética e de resistência antimicrobiana).
- Qualquer cepa isolada de líquidos normalmente estéreis (sangue, líquido, líquido pleural, líquido abdominal e outros) deve ser encaminhada ao IAL.
- A cepa bacteriana enviada ao IAL sem sua identificação e sem informação dos dados do paciente não tem valor epidemiológico.
- Qualquer dúvida sobre os procedimentos, entrar em contacto com o Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, Centro de Bacteriologia, tel: (011) 3068 2894 / 3068 2893.



**Acondicionamento, transporte e manuseio de amostras destinadas à pesquisa de
N. meningitidis, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* por meio da técnica de PCR
em Tempo-Real**

1. Tipo de amostras

As amostras apropriadas para este exame são líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro. Material após o óbito poderá ser utilizado em alguns casos específicos (ver item 7).

2. Volume ideal da amostra

A amostra ideal de LCR deve ter um volume mínimo de 500 µL e a de soro de 200 µL. Amostras com volumes menores que o ideal serão processadas, entretanto o resultado do exame poderá ser prejudicado e uma observação referente ao volume inadequado recebido para análise constará no laudo.

Em caso de fragmento de tecidos, um pedaço de aproximadamente 5 mm³ (tamanho de um grão de feijão) é suficiente para as análises.

3. Manuseio das amostras

3.1. Sempre que possível, realizar a manipulação das amostras dentro da cabine de segurança biológica.

3.2. A cabine deve ser irradiada com luz ultravioleta por no mínimo 15 minutos antes de ser usada.

3.3. Amostras destinadas à PCR em tempo real devem ser divididas em alíquotas antes de serem manipuladas para outros testes, tais como cultura, CIE e Látex.

3.5. Para amostras de sangue total, centrifugar os tubos por 15 a 20 minutos a 3000 rpm e coletar o sobrenadante para o ensaio.

3.6. Sempre que possível utilizar ponteiros descartáveis com bloqueio de aerossol. Caso isso não seja possível, utilizar pipeta Pasteur nova. Nunca utilizar material reciclado mesmo que autoclavado.

3.7. Não manipular as amostras destinadas a PCR em tempo real perto de áreas onde seja feita cultura ou suspensões bacterianas.

4. Acondicionamento da amostra

4.1. Preferencialmente, as amostras devem ser armazenadas em tubos novos, pequenos, com tampa de rosca com anel de vedação (tipo “cryovials”), próprios para o acondicionamento e encaminhamento das amostras (Figura 1). Frascos como o coletor universal estéril, frasco com lacre metálico, frasco sem tampa de rosca e sem vedação e tubos tipo Eppendorf não devem ser utilizados, a fim de aumentar a qualidade e biossegurança, impedindo inclusive a contaminação de indivíduos durante o transporte (Figura 2).



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

4.2. Fechar a tampa do tubo, evitando derramamentos ou vazamentos. Se ocorrer derramamento da amostra sobre quaisquer superfícies de trabalho, proceder, imediatamente, à desinfecção das áreas com solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v).

4.3. As amostras de fragmento de tecidos devem ser enviadas em tubos com ou sem solução salina estéril. Nunca em formol.

4.4. As amostras devem ser estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu transporte.



Figura 1. Exemplos de frascos/tubos **ADEQUADOS** para o acondicionamento de amostras líquidas e materiais após o óbito.



Figura 2. Exemplos de frascos/tubos que **NÃO** devem ser utilizados no acondicionamento e transporte dos materiais biológicos.



5. Transporte e encaminhamento das amostras

5.1. O transporte deve ser feito em caixa própria para o transporte de material biológico (UN3373) seguindo as normas de biossegurança (Figura 3).

5.2. O transporte deve ser feito rapidamente, preferencialmente congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em gelo seco, ou no mínimo a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3. As amostras devem ser encaminhadas para o Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas do IAL Central com solicitação de exame “PCR para Meningites Bacterianas” (ver endereço abaixo).



Figura 3. Acondicionamento, transporte e manuseio das amostras biológicas em condições ideais (link da Fiocruz: <https://www.fiocruz.br/portal/pt-br/seguranca-biologica/transporte-de-amostras-biologicas>)



http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/informeemail/301106/mat_04_30_11.htm).

6. Rejeição de amostras

Serão rejeitadas todas as amostras que chegarem:

- 6.1. Sem vedação adequada com evidências de vazamento.
- 6.2. Com lacre metálico ou com fita adesiva (fita crepe, esparadrapo, etc.) com evidências ou não de vazamento.

7. Tipo de material e coleta de material após o óbito

Os materiais que são aceitos para processamento e realização do exame de PCR são: cérebro, cerebelo, baço, fígado, coração, pulmão, LCR e/ou sangue após o óbito. A coleta deve ser feita o mais rapidamente possível, preferencialmente em até 24 horas após o óbito. Sangue e LCR em até 8 horas.

8. Endereço para envio das amostras

Instituto Adolfo Lutz, Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas, Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo – SP – CEP: 01246902

Para notificações de casos de meningites bacterianas e informações epidemiológicas adicionais, ligar para 0800 555466 (CVE-SP), à disposição 24 horas.

Qualquer dúvida sobre os procedimentos, entrar em contacto com o Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, Centro de Imunologia, Laboratório de Meningites Bacterianas, Claudio T Sacchi, Fone: 011 3068-2899, Email: ctsacchi@gmail.com, das 8:00 as 17:00 horas.

Exames laboratoriais das meningites bacterianas realizadas após o óbito pelo Instituto Adolfo Lutz Central

Amostras possíveis

PUNÇÃO SUB-OCIPITAL OU LOMBAR: Líquor - Exame: PCR

PUNÇÃO PERIFÉRICA: sangue não coagulado - Exame: PCR

PUNÇÃO CARDÍACA: sangue não coagulado - Exame: PCR

BIÓPSIA: fragmento de meninge, cérebro, cerebelo, baço, fígado, coração - Exame: PCR



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

OBSERVAÇÕES

Após o óbito as amostras devem ser coletadas com condições máximas de assepsia, acondicionadas em frascos ou tubos estéreis e enviadas ao laboratório com urgência, em temperatura ambiente.

As amostras deverão ser encaminhadas com a ficha de solicitação (SINAN), com todos os dados preenchidos. O(s) frasco(s) deve(m) ser devidamente identificado(s) (nome completo do paciente, tipo de material enviado e data da coleta). As amostras enviadas em desacordo com o protocolo não serão processadas.



Coleta e Semeadura de Lesão Petequial

Raspado da Lesão

Fazer assepsia da pele no local da lesão com álcool 70%¹⁻³.

Escarificar o centro da lesão, com auxílio de uma ponta de agulha estéril (calibre 21 ou 23) até que comece um leve sangramento¹.

Coletar o material exposto pela escarificação da lesão preferencialmente com alça bacteriológica descartável. O material também poderá ser coletado com *swab* de rayon ou alginato de cálcio, todavia esta alternativa possui menor rendimento¹⁻³.

Semear imediatamente, por esgotamento, o material coletado, em um quarto da placa de BHI chocolate a 10%, nas condições mais assépticas possíveis. Adicionalmente, com o material coletado da lesão, fazer esfregaços de 3 a 4 mm de diâmetro, em lâminas de microscopia para coloração de Gram¹⁻³.

As lâminas e as placas de meio de cultura semeadas devem ser enviadas ao laboratório, à temperatura ambiente, imediatamente após a coleta.

No laboratório, recomenda-se²⁻³:

- Após a secagem, fixar os esfregaços cobrindo a lâmina com duas gotas de metanol por 1 minuto; drenar o excesso, sem lavar. Proceder à coloração de Gram.

-Estriar o material na placa com auxílio de uma alça bacteriológica estéril

- Incubar as placas em estufa, sob atmosfera de 5 a 10% de CO₂, a 37°C, por 24 a 48 horas.

Aspirado da Lesão

Fazer assepsia da pele no local da lesão com álcool 70%¹⁻³.

Pinçar uma dobra da pele entre o dedo indicador e o polegar, de modo que empalideça o tecido em volta e destaque o ponto hemorrágico no alto da prega¹.

Com uma seringa de tuberculina e agulha hipodérmica estéril, injetar um pequeno volume de 0,1 a 0,2 ml (dependendo do tamanho da petéquia) de solução fisiológica estéril no centro da lesão petequial e, em seguida, aspirar o líquido injetado^{1,3}.

Dispensar o material aspirado imediatamente em um canto de uma placa de BHI chocolate a 10% e, em seguida, estriar o material na placa com auxílio de uma alça bacteriológica descartável ou *swab* de rayon ou alginato de cálcio¹⁻³. Adicionalmente, com o material aspirado, fazer esfregaços de 3 a 4 mm de diâmetro, em lâminas de microscopia para coloração de Gram¹⁻³.



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

As lâminas e as placas de meio de cultura semeadas devem ser enviadas ao laboratório, à temperatura ambiente, imediatamente após a coleta.

No laboratório, recomenda-se²⁻³ :

- Após a secagem, fixar os esfregaços cobrindo a lâmina com duas gotas de metanol por 1 minuto; drenar o excesso, sem lavar. Proceder à coloração de Gram.

-Estriar o material na placa com auxílio de uma alça bacteriológica estéril

- Incubar as placas em estufa, sob atmosfera de 5 a 10% de CO₂, a 37°C, por 24 a 48 horas.

Bibliografia

1. Avaliação da reação da polimerase em cadeia pra identificação e genogrupagem de *Neisseria meningitidis* em amostras de líquidos cérebro-espinhal. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Maria Cristina Rebelo. Rio de Janeiro, 2009.
2. Manual de Vigilancia Epidemiológica- Febre Purpúrica Brasileira. Normas e Instruções. 1994
3. Normas e Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Ministério da Saúde. 1986