



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROF. ALEXANDRE VRANJAC
DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO RESPIRATÓRIA
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 6º andar – Sala 601 – São Paulo/SP – CEP: 01246-000
Tel.: (11) 3066 8544/8757/8289/8236 – e-mail: dvresp@saude.sp.gov.br



PROTOCOLO LABORATORIAL: MENINGITES BACTERIANAS

Atualização – setembro de 2017

Acondicionamento, transporte e manuseio de cepas de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*

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 acondicionamento, transporte e manuseio evitando-se contaminação e morte das bactérias.

Outras bactérias que podem causar meningite são: *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus agalactiae* ou *pyogenes* ou *sp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis* ou *sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Serratia marcescens* ou *sp*, *Acinetobacter baumannii*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia*, *Leptospira* e *Proteus sp*.

1. Manuseio

O manuseio das culturas deve obedecer às normas internacionais de biossegurança. As bactérias são consideradas agentes infecciosos de Risco Biológico Nível 2, que corresponde a moderado risco individual e limitado risco para a comunidade. Entretanto este risco aumenta para os profissionais que manipulam rotineiramente isolados de *N. meningitidis* quando comparado com o risco da população em geral. Para estes profissionais estão indicadas as vacinas meningocócicas conjugadas. A recomendação é que as cepas sejam manipuladas por profissionais treinados para o trabalho com agentes patogênicos; em cabines de segurança biológica-NB2 e com 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 curto período de tempo - *Neisseria meningitidis* por 2 a 3 dias, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* por 4 a 5 dias. Portanto, as culturas devem ser repicadas após este período ou as bactérias devem ser mantidas congeladas. Os meios de cultura mais utilizados são: ágar sangue de carneiro 5% ou ágar chocolate 5% para *S. pneumoniae*; ágar sangue de carneiro 5% ou ágar chocolate 5% para *N. meningitidis* e ágar chocolate 5% enriquecido com vitox para *H. influenzae*.

Para as outras bactérias que podem causar meningite pode ser necessário o uso de outros meios de cultura específicos como ágar MacConkey ou Tryptic Soy ágar ou similares.



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 e a temperatura ambiente. Culturas em caldo não devem ser utilizadas, pois facilitam a contaminação e diminuem a viabilidade da cepa. O melhor modo de manter a viabilidade da cepa isolada por período prolongado é liofilizar ou congelar. Para o congelamento pode ser utilizado leite desnatado a 10% ou caldo (TSB, Muller Hinton) com 15% de glicerol e manter a -70°C ou a -120°C (nitrogênio). O congelamento a -20°C pode ser utilizado, porém se espera perda de viabilidade da cepa em 3 a 6 meses.

3. Transporte

As culturas/cepas bacterianas devem ser transportadas em meios de cultura sólidos, adequados para cada espécie e sem refrigeração. Podem ser utilizados 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 ou em caldo de cultura.

O empacotamento das culturas/cepas para transporte 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. Na caixa de transporte deve ser colocada 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 de sua identificação no laboratório de origem (número da cepa, data, endereço e telefone do laboratório de isolamento, cidade e outros) e dos dados demográficos do paciente (nome, idade, suspeita clínica, material clínico de isolamento, cidade de residência, medicação e outros).

OBSERVAÇÕES

- A identificação do agente etiológico pela cultura é fundamental para a vigilância epidemiológica, é considerado o exame padrão ouro, pois permite a caracterização antigênica, genética e de resistência antimicrobiana.
- Qualquer cepa isolada de líquidos normalmente estéreis (sangue, líquido pleural, líquido abdominal e outros) deve ser encaminhada ao IAL.
- A cepa bacteriana enviada ao IAL sem identificação e sem informação dos dados do paciente não tem valor epidemiológico.
- Lembramos que a realização da cultura de líquido cabe aos laboratórios dos hospitais/municípios/regiões de atendimento do caso, assim como os exames quimiocitológico, bacterioscopia, látex e hemocultura.



- Qualquer dúvida sobre os procedimentos entrar em contato com o IAL-São Paulo, Centro de Bacteriologia, telefones (11) 3068-2894 e 3068-2893 ou pelo *e-mail* bacteriologia@ial.sp.gov.br.

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 (qPCR)

1. Tipo de amostra

As amostras apropriadas para a qPCR são líquido e soro. Fragmentos de tecidos após o óbito poderão ser utilizados em casos específicos (ver item 8).

2. Volume da amostra

O volume ideal de líquido ou soro deve ser de, no mínimo, 400 µL (0,4 mL). Amostras com volume menor que o ideal serão processadas, no entanto o resultado do exame poderá ser prejudicado e uma observação referente ao volume inadequado para análise constará no laudo.

No caso de fragmentos de tecidos, uma amostra de aproximadamente 5 mm³ (tamanho de um grão de feijão) é suficiente para as análises.

3. Manuseio da amostra

Sempre que possível manusear as amostras dentro de cabine de segurança biológica. A cabine deve ser irradiada com luz ultravioleta por no mínimo 15 minutos antes de ser usada. As amostras destinadas a qPCR devem ser divididas em alíquotas antes de serem manipuladas para outros exames, como cultura e látex.

Os tubos com amostras de sangue total devem ser centrifugadas por 15 a 20 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante coletado para o ensaio.

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

Não manipular as amostras destinadas a qPCR perto de áreas onde sejam realizadas culturas ou suspensões bacterianas.

4. Acondicionamento da amostra

As amostras/alíquotas devem ser armazenadas preferencialmente em tubos novos, pequenos, com tampa de rosca com anel de vedação (criotubo), próprios para o acondicionamento e encaminhamento como mostrado na 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, pois podem facilitar o vazamento do líquido biológico ou do sangue contido nos fragmentos de tecidos, prejudicando a qualidade dos ensaios e a biossegurança tanto dos indivíduos

durante o transporte quanto dos funcionários responsáveis pela manipulação das amostras (Figura 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).

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

As amostras devem ser estocadas a -20°C até o transporte.



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



Frasco coletor universal estéril

Frasco com lacre metálico

Frascos com tampa não rosqueável e sem vedação

Tubos tipo Eppendorf

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



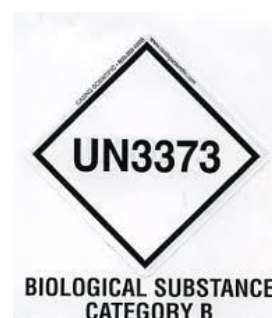
5. Transporte e encaminhamento das amostras pelos IAL Regionais

As amostras devem ser previamente congeladas a -20°C e encaminhadas em gelo seco preferencialmente, ou pelo menos, mantidas congeladas com gelox em caixas de isopor para garantir a qualidade da amostra. Os tubos devem ser mantidos em pé durante o transporte para impedir possíveis derramamentos.

Os tubos com fragmentos de tecidos pós-óbito devem ser embalados individualmente com saco plástico para auxiliar na contenção do material.

6. Transporte e encaminhamento das amostras pelos IAL Regionais

O transporte das amostras deve ser realizado em caixa própria para transporte de material biológico (UN3373), seguindo as normas de biossegurança (Figura 3). As amostras devem ser encaminhadas em gelo seco para garantir a qualidade ao Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas do IAL-São Paulo com a solicitação de exame de PCR para Meningites Bacterianas (ver endereço abaixo).





GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROF. ALEXANDRE VRANJAC
DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO RESPIRATÓRIA
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 6º andar – Sala 601 – São Paulo/SP – CEP: 01246-000
Tel.: (11) 3066 8544/8757/8289/8236 – e-mail: dvresp@saude.sp.gov.br

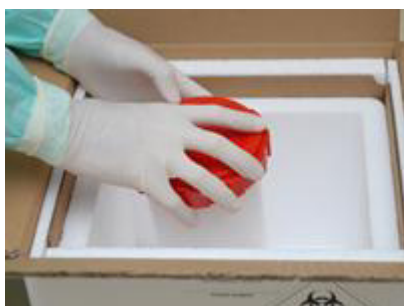


Figura 3. Acondicionamento, transporte e manuseio das amostras biológicas em condições ideais.

7. Rejeição de amostra

Serão rejeitadas as amostras que chegarem sem vedação adequada com evidências de vazamento ou com lacre metálico ou com fita adesiva (fita crepe, esparadrapo) com evidências ou não de vazamento.

8. Tipo de material e coleta após o óbito

Os materiais/fragmentos aceitos para processamento e realização da qPCR são: meninge, cérebro, cerebelo, baço, fígado, coração, líquido e sangue (periférico ou cardíaco). Os fragmentos de tecidos devem estar *in natura* ou em solução salina, nunca em formol.

A coleta deve ser feita o mais rápido possível, utilizando um frasco para cada fragmento de tecido, preferencialmente em até 24 horas após o óbito. Sangue e líquido em até 8 horas. O(s) frasco(s) deve(m) ser devidamente identificado(s) (nome completo do paciente, tipo de material enviado e data da coleta).

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

Qualquer dúvida sobre os procedimentos para qPCR entrar em contato com o IAL-São Paulo, Centro de Imunologia, com Maristela Salgado, telefone (11) 3068-2899 ou pelo e-mail redes.pcr@gmail.com.

Coleta e semeadura de amostras de lesão petequial

1. Raspado da Lesão

Fazer assepsia da pele no local da lesão com álcool 70%. Escarificar o centro da lesão, com auxílio de uma ponta de agulha estéril (calibre 21 ou 23) até que comece um leve sangramento. 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 estas alternativas têm menor rendimento.

Semear imediatamente, por esgotamento, o material coletado, em placa com ágar sangue de carneiro 5% ou ágar chocolate 5%, 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 Gram.

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-se 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. Com relação à cultura, estriar o material na placa com auxílio de uma alça bacteriológica estéril e incubar as placas em estufa, sob atmosfera de 5 a 10% de CO₂, a 37°C, por 24 a 48 horas.

2. Aspirado da Lesão

Fazer assepsia da pele no local da lesão com álcool 70%. 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 prega.

Com uma seringa tuberculínica 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 e, em seguida aspirar o líquido injetado.

Dispensar o material aspirado imediatamente em placa com ágar sangue de carneiro 5% ou ágar chocolate 5% e, em seguida, estriar o material na placa com auxílio de uma alça bacteriológica descartável ou *swab* de rayon ou alginato de cálcio.

Adicionalmente, com o material aspirado, fazer esfregaços de 3 a 4 mm de diâmetro, em lâminas de microscopia para coloração de Gram.

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-se proceder como orientado para o raspado da lesão.

Acondicionamento e transporte de amostras destinadas à pesquisa de leptospira

1. Pesquisa por cultura

Realizar a coleta de líquido e/ou sangue preferencialmente antes da administração de antibióticos e na primeira semana do início dos sintomas.

Líquor – coletar e semear assepticamente 1 mL da amostra em tubo com meio de cultura para leptospiros.

Sangue – coletar e semear no momento da coleta, assepticamente, dois tubos com meio de cultura para leptospiros. Um tubo com 1 gota de sangue e o outro com 2 gotas de sangue.

Conservar e transportar a temperatura ambiente a ao abrigo da luz em caixa isotérmica.

Os meios de cultura devem ser retirados no laboratório de leptospirose do Centro de Bacteriologia, IAL-São Paulo.



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROF. ALEXANDRE VRANJAC
DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO RESPIRATÓRIA
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 6º andar – Sala 601 – São Paulo/SP – CEP: 01246-000
Tel.: (11) 3066 8544/8757/8289/8236 – e-mail: dvresp@saude.sp.gov.br



2. Teste de aglutinação microscópica

Coletar 1 a 3 mL de líquido em tubo de polipropileno estéril com tampa rosqueada. Conservar em geladeira e transportar entre 2 a 8°C (até 24 horas) com gelo reciclável em caixa isotérmica.

OBSERVAÇÕES

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).

Para mais informações consultar o manual eletrônico de exames em <http://www.ial.sp.gov.br/ial/servicos/exames-amostras-biologicas>.

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

Referências

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.

Manual de Vigilância Epidemiológica- Febre Purpúrica Brasileira. Normas e Instruções. 1994

Normas e Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Ministério da Saúde. 1986

Este documento foi elaborado e atualizado pela equipe técnica da Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do CVE/CCD/SES-SP e pelas equipes técnicas dos Centros de Imunologia e Bacteriologia do IAL - São Paulo, em setembro de 2017.