

GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

6ª edição



ANEXO A – PROCEDIMENTOS TÉCNICOS PARA COLETA DAS AMOSTRAS

O diagnóstico etiológico dos casos suspeitos de meningite é de extrema importância para a vigilância epidemiológica, tanto na situação endêmica da doença quanto em situações de surto.

Para todo caso suspeito de meningite bacteriana, deve-se utilizar o kit de coleta para o diagnóstico laboratorial, distribuído pelos Lacen para todos os laboratórios locais.

Esse kit é composto de:

- Um frasco para hemocultura com caldo TSB ou BHI acrescido do anticoagulante SPS.
- Um frasco com o meio de cultura ágar chocolate base Müller-Hinton e 5% de sangue desfi-brinado de carneiro ou cavalo.
- Três frascos estéreis sem anticoagulante, preferencialmente com tampa de borracha, sendo um para coleta de sangue (obtenção do soro) e os outros dois para a coleta de líquido cefalorraquidiano (LCR), nos quais serão realizados os exames citoquímico, bacterioscopia e os de aglutinação do látex e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).
- Duas lâminas sem uso prévio, perfeitamente limpas e desengorduradas, para bacterioscopia (uma é corada e processada no laboratório do hospital e a outra é enviada para o Lacen).

► COLETA DO LCR

A punção do LCR é um procedimento invasivo e requer precauções semelhantes aos de um ato cirúrgico. Quando solicitada, deve ser feita exclusivamente por médico especializado, em um centro com as condições mínimas para esse tipo de procedimento.

A punção é frequentemente realizada na região lombar, entre as vértebras L1 e S1, sendo mais indicados os espaços L3-L4, L4-L5 ou L5-S1. Uma das contra-indicações para a punção lombar é a existência de infecção no local da punção (piodermite). No caso de haver hipertensão endocraniana grave, é aconselhável solicitar um especialista para a retirada mais cuidadosa do líquido, ou aguardar a melhora do quadro, priorizando-se a análise de outros espécimes clínicos.

Após a coleta de 3 mL de LCR, o médico, ainda na sala de coleta, deve proceder do seguinte modo:

- Semear 0,5 mL a 1 mL do LCR em meio de cultura ágar chocolate.
- O restante do LCR deve ser colocado em dois frascos separadamente, um para os exames de bacterioscopia e citoquímico, e o outro para o látex e qPCR.

► COLETA DO SANGUE

No sangue, são realizados os exames de cultura (hemocultura), látex e qPCR. Os procedimentos para a coleta do sangue são:

- Selecionar uma área com veia periférica de fácil acesso e garrotear.
- Com algodão, aplicar álcool a 70% em forma concêntrica, partindo do lugar de onde a amostra vai ser coletada para a área periférica.

- Aplicar solução de polivinilpirrolidona iodo (PVPI) a 10% e esperar que seque para que exerça sua ação oxidante. Caso o paciente seja alérgico ao iodo, deve-se efetuar duas vezes a aplicação do álcool a 70%.
- Colher aproximadamente 3 mL a 5 mL de sangue venoso quando se tratar de crianças, e 5 mL a 10 mL em caso de adultos.
- Semear o sangue, inoculando-o no frasco de cultura em um volume apropriado para que sua diluição final no meio seja de 10% a 15% (cultura pediátrica) ou 10% a 20% para adultos. Para meios de cultura industrializados, deve-se seguir a recomendação do fabricante.
- Inclinar lentamente o frasco para evitar a formação de coágulos.
- Distribuir o volume de sangue restante (3 mL) no frasco sem anticoagulante para obter o soro no qual serão realizados os testes de aglutinação do látex e qPCR.

► FLUXO INTERLABORATORIAL

Laboratório Local (LL)

- Semeia o LCR.
- Realiza os exames quimiocitológico, bacterioscópico e látex (no soro e LCR).
- Encaminha ao Lacen:
 - ▶ o material semeado (LCR e sangue) para isolamento e identificação bacteriana;
 - ▶ o soro e o LCR para realização de qPCR, quando implantado no Lacen; e
 - ▶ as duas lâminas de bacterioscopia para CQ, sendo uma corada e a outra não.
 - ▶ Informar os resultados à vigilância epidemiológica.

Quando o LL realizar a cultura, deverá enviar a cepa isolada para o Lacen.

Laboratório de Referência Estadual (LRE) – Lacen

- Faz o qPCR no soro e LCR, caso a técnica esteja implantada no Lacen.
- Procede à semeadura do LCR e/ou aos exames que não tenham sido feitos pelo LL.
- Confirma a identificação bioquímica e sorológica das cepas bacterianas recebidas ou por ele isoladas.
- Faz teste de sensibilidade – concentração inibitória mínima (CIM).
- Fecha os casos com a vigilância epidemiológica.
- Envia ao LRR amostras de soro e líquido para o controle de qualidade analítica.
- Encaminha ao LRN as cepas de *Neisseria meningitidis* (Men), *Haemophilus influenzae* (Hi), e *Streptococcus pneumoniae* (Spn) dos casos fechados ou de resultados, respectivamente, para controle da qualidade (CQ) ou para a conclusão diagnóstica.

Laboratório de Referência Nacional (LRN)

- Confirma a CIM das cepas isoladas segundo critérios do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).
- Procede ao CQ das cepas identificadas e que lhe foram enviadas pelos Lacen.
- Realiza os exames necessários para os resultados inconclusivos enviados pelos Lacen e qPCR em casos especiais, como surtos e óbitos.

Observação:

Os resultados e os laudos laboratoriais deverão ser liberados no Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), que tem como gestora a Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/Daevs/SVSA/MS). O GAL é um sistema informatizado que foi desenvolvido com o objetivo de proporcionar o gerenciamento das análises laboratoriais da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, assim como disponibilizar informações oportunas em tempo real e auxiliar nas ações estratégicas das esferas da gestão da vigilância laboratorial.

Todo material deverá ser enviado ao Lacen, devidamente identificado e acompanhado de cópia da Ficha de Investigação do Sinan, que servirá de orientação quanto aos exames indicados.

O perfeito acondicionamento, para remessa de amostras, é de fundamental importância para o êxito dos procedimentos laboratoriais.

Para cultura, realizar a semeadura do LCR no local de coleta sempre que possível. Caso contrário, enviá-lo em temperatura ambiente para ser semeado no laboratório.

► CONSERVAÇÃO, TRANSPORTE E BIOSSEGURANÇA

- Para cultura, transportar o material clínico em temperatura ambiente o mais imediatamente possível ao laboratório. Nunca transportá-lo congelado ou sob refrigeração.
- As amostras semeadas de LCR e sangue do mesmo modo devem ser encaminhadas ao laboratório em temperatura ambiente o mais rapidamente possível.
- Os exames citoquímico e bacterioscópico devem ser feitos em menor tempo possível para evitar a deterioração celular e bacteriana, o que dificulta suas identificações.
- O líquor e o sangue/soro para os exames da aglutinação do látex e qPCR podem ser conservados em temperatura ambiente por até uma hora. Caso não seja possível realizar os exames nesse tempo, é necessário conservá-los em geladeira a 4°C por até 24 horas e, acima desse tempo, congelá-los.
- O frasco deve estar envolvido em papel alumínio ou papel de embalagem estéril. Para evitar quebra ou perda do espécime durante o transporte, os frascos devem estar acondicionados em uma caixa devidamente protegida com espuma flon ou papel, e com uma seta sinalizando o sentido em que deve ser carregada.
- Devem-se registrar nas caixas os nomes do remetente e do destinatário, e que se trata de material biológico.

▶ DETALHAMENTO A RESPEITO DOS PRINCIPAIS EXAMES LABORATORIAIS REALIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DAS MENINGITES

A seguir, descrevem-se os exames laboratoriais disponíveis, a interpretação deles e as normas de coleta dos espécimes clínicos. Para isso, é necessário que a coleta seja realizada no ato da entrada do paciente na unidade de saúde, no primeiro atendimento, preferencialmente antes da utilização da primeira dose do antibiótico (Quadro 1).

Cultura

Tanto para o LCR quanto para o sangue, é um exame de alto grau de especificidade. Seu objetivo é identificar a espécie da bactéria, podendo ser realizado com diversos tipos de fluidos corporais, sendo o padrão-ouro para diagnóstico das meningites. A identificação do sorogrupo ou dos sorotipos das cepas bacterianas isoladas é de grande relevância para acompanhar as tendências das meningites e para a investigação de surtos e/ou epidemias. As cepas devem ser encaminhadas ao Lacaen e ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL) para estudos moleculares complementares.

Agglutinação pelo látex

Partículas de látex, sensibilizadas com antissoros específicos, permitem, por técnica de agglutinação rápida (em lâmina ou placa), detectar o antígeno bacteriano em líquido. Pode ocorrer resultado falso-positivo em indivíduos portadores do fator reumático ou em reações cruzadas com outros agentes. A sensibilidade do teste de látex é da ordem de 90% para *H. influenzae*, 94,4% para *S. Pneumoniae* e 80% para *N. meningitidis*. A especificidade da reação é de 97%.

Bacterioscopia

A coloração do LCR pela técnica de Gram permite, ainda que com baixo grau de especificidade, caracterizar morfológica e tintorialmente as bactérias presentes. Pode ser realizada a partir do líquido e de outros fluidos corpóreos normalmente estéreis e raspagem de petéquias.

Quimiocitológico

Compreende o estudo da celularidade, ou seja, permite a contagem e o diferencial das células e as dosagens de glicose e proteínas do LCR. Traduz a intensidade do processo infeccioso e orienta a suspeita clínica, mas não deve ser utilizado para conclusão do diagnóstico final, por seu baixo grau de especificidade.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção do DNA bacteriano pode ser obtida por amplificação da cadeia de DNA pela enzima polimerase, que permite a identificação do agente utilizando oligonucleotídeos específicos. A qPCR é uma modificação da técnica tradicional de PCR que identifica o DNA-alvo com maior sensibilidade e especificidade e em menor tempo de reação. A qPCR já está validada no Brasil, sendo a técnica utilizada na rotina diagnóstica das meningites bacterianas em alguns Lacaen e no Laboratório de Referência Nacional (BEPA, 2007).

Além dos métodos supracitados, há outros inespecíficos que são utilizados de forma complementar. São eles: tomografia computadorizada, raios-X, ultrassonografia, angiografia cerebral e ressonância magnética.

Os exames realizados pelos Lacen são: cultura, antibiograma, látex, bacterioscopia e qPCR. Nenhum dos exames citados substitui a cultura de líquido e/ou sangue. A recuperação do agente etiológico viável é de extrema importância para a sua caracterização e para o monitoramento da resistência bacteriana aos diferentes agentes microbianos.

Na suspeita de meningite por agente bacteriano anaeróbico, a eliminação do ar residual deve ser realizada após a coleta do material. É necessário transportar na própria seringa da coleta, com agulha obstruída, em tubo seco e estéril, ou inoculada direto nos meios de cultura. Em temperatura ambiente, o tempo ótimo para transporte de material ao laboratório é de 15 minutos para um volume menor que 1 mL, e de 30 minutos para um volume superior.

O exame de látex deve ser processado com muito cuidado para que não ocorram reações inespecíficas. É preciso observar, portanto, as orientações do manual do kit, uma vez que a sensibilidade do teste varia de acordo com o produtor.

QUADRO 1 – Coleta* e conservação de material para diagnóstico de meningite bacteriana

TIPO DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE MATERIAL	QUANTIDADE	N.º DE AMOSTRAS	RECIPIENTE	ARMAZENAMENTO / CONSERVAÇÃO	TRANSPORTE
Cultura	Sangue	10% a 20% do volume total do frasco	1	Frasco adequado para hemocultura (caldo BHI ou TSB acrescido de SPS)	<ul style="list-style-type: none"> Colocar imediatamente em estufa entre 35°C e 37°C, logo após a semeadura, até o envio ao laboratório. Fazer subculturas em ágar chocolate após 8 horas. 	<ul style="list-style-type: none"> Nunca refrigerar. Manter o frasco em temperatura ambiente e encaminhar o mais rápido possível para o laboratório.
	Líquor	5 a 10 gotas	1	<ul style="list-style-type: none"> Frasco com meio de cultura ágar chocolate base Müller-Hinton ou similar. Semear imediatamente ou até 3 horas após a punção. 	<ul style="list-style-type: none"> Incubar a 35°C a 37°C em atmosfera de CO² (chama de vela), úmido após a semeadura, até o envio ao laboratório. 	<ul style="list-style-type: none"> Nunca refrigerar. Manter o frasco em temperatura ambiente e encaminhar o mais rápido possível para o laboratório.
Látex	Líquor	1 mL a 2 mL	1	Frasco estéril	<ul style="list-style-type: none"> Em temperatura ambiente, em até 1 hora. Tempo superior a 1 hora, conservar a 4°C. Pode ser congelado, se o exame não for realizado nas primeiras 24 horas. Estocar o restante para a necessidade de realizar outros procedimentos. 	Enviar imediatamente ao laboratório, conservado em gelo.
Bacterioscopia	Líquor	1 gota a partir do sedimento do material do quimicitológico	2	2 lâminas de microscopia virgens	Em temperatura ambiente.	Em temperatura ambiente, em embalagem apropriada.

continua

conclusão

TIPO DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE MATERIAL	QUANTIDADE	N.º DE AMOSTRAS	RECIPIENTE	ARMAZENAMENTO / CONSERVAÇÃO	TRANSPORTE
Químico -citológico	Líquor	2 mL	1	Frasco estéril	<ul style="list-style-type: none"> Em temperatura ambiente, em até 3 horas. Tempo superior a 3 horas, conservar a 4°C. 	Enviar imediatamente ao laboratório.
Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	Líquor e/ou soro	Mínimo 500 µL	1	<ul style="list-style-type: none"> Frasco estéril. As amostras devem ser aliquotadas em tubos novos, pequenos, com tampa de rosca com anel de vedação (tipo <i>cryovials</i>). 	As amostras devem ser estocadas a -20°C até seu transporte.	<ul style="list-style-type: none"> Deve ser feito rapidamente, preferencialmente congelada a -20°C ou em gelo seco. Obrigatoriamente empregar caixa própria para o transporte interestadual de material biológico (UN3373) seguindo as normas de biossegurança.
	Material <i>post-mortem</i> (sangue pós-óbito e fragmentos de tecidos).	<ul style="list-style-type: none"> Sangue e LCR pós-óbito (500 µL). Fragmentos de tecidos (cérebro; baço ou fígado), coletar 20 mg (tamanho de um grão de feijão). Congelar in natura ou em salina estéril. 	No máximo em até 8 horas após o óbito	<ul style="list-style-type: none"> Seguir as mesmas instruções citadas acima. Colocar os fragmentos em tubos separados. Nunca conservar em formol. 	As amostras devem ser estocadas a -20°C até seu transporte.	<ul style="list-style-type: none"> Deve ser congelado rapidamente, a -20°C ou em gelo seco. Obrigatoriamente empregar caixa própria para o transporte interestadual de material biológico (UN3373) seguindo as normas de biossegurança.

Fonte: CGLAB/Daevs/SVSA/MS.

*A coleta do material clínico deve ser realizada preferencialmente no ato do primeiro atendimento.