

Informe técnico

Meningites Bacterianas: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos

Bacterial Meningitis: Diagnosis and Laboratory Characterization of the Etiological Agents

Meningites Bacterianas: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos

Bacterial Meningitis: Diagnosis and Laboratory Characterization of the Etiological Agents

Bernadete L. Liphhaus^[1], Rosimeire Cobo Zanella^[2], Ana Paula S. Lemos^[2], Samanta C. G. Almeida^[2], Erica Chimara^[2], Roberta M. Blanco^[2], Fabio T. Higa^[3], Maria Gisele Gonçalves^[3], Maristela M. Salgado^[3], Lucila O. Fukasawa^[3], Fabiana Cristina Pereira dos Santos^[4], Telma R.M.P. Carvalhanas^[1]

^[1]Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (DDTR), Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), São Paulo, Brasil. ^[2]Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), São Paulo, Brasil. ^[3]Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), São Paulo, Brasil. ^[4]Laboratório de Riquetsias, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

A meningite bacteriana pode ser causada por diversas espécies de bactérias, sendo as principais *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*.

O principal reservatório destas bactérias é a nasofaringe humana, particularmente os indivíduos portadores. As bactérias são transmitidas de pessoa a pessoa por meio de contaminação oral-oral (por meio de gotículas), ou seja, quando do compartilhamento de alimentos, bebidas ou cigarros, do beijo, ou da tosse ou espirro.

O diagnóstico laboratorial para identificação do agente etiológico causador da meningite é de extrema importância para a vigilância epidemiológica e para as medidas de prevenção e controle. A identificação do agente etiológico pela cultura é considerada o exame padrão ouro, pois permite a caracterização antigênica (sorogrupo/sorotipo/sorosubtipo), genética (genotipo/clone), e de resistência antimicrobiana.

O exame quimiocitológico do líquido permite a contagem e o diferencial das células, as dosagens de glicose e proteínas, e deste modo, expressa a intensidade do

processo inflamatório/infeccioso e orienta a suspeita clínica. Nas meningites bacterianas ocorre maior celularidade e o predomínio mantido de neutrófilos (Quadro 1). O exame quimiocitológico não deve ser utilizado na conclusão do diagnóstico das meningites por sua baixa especificidade.

A cultura, tanto de líquido quanto de sangue (hemocultura), tem alta especificidade e sua realização é de responsabilidade dos laboratórios dos hospitais, municípios, e regiões de atendimento do caso, assim como os exames de antibiograma, quimiocitológico, bacteroscopia e o teste de aglutinação pelo látex.

As cepas de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* isoladas de líquidos considerados normalmente estéreis (sangue, líquido, líquido pleural, líquido abdominal e outros) devem ser encaminhadas para sua completa caracterização e confirmação da concentração inibitória mínima (CIM) ao Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo.

Amostras de líquido e/ou sangue também podem ser encaminhadas aos IAL regionais e/ou Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas do IAL de São Paulo para a realização de PCR em Tempo Real (qPCR).

No contexto de um surto e/ou agregado de casos (ocorrência de doença em frequência inesperada) o IAL poderá analisar as amostras de todos os casos.

Este informe técnico tem por objetivo aprimorar o acondicionamento, manuseio, manutenção e transporte de amostras biológicas destinadas ao diagnóstico e caracterização laboratorial dos agentes etiológicos que causam meningites bacterianas.

Quadro 1. Exame quimiocitológico de líquido nas meningites de acordo com a suspeita clínica

Diagnóstico	Aspecto	células (leucócitos/mm ³)	proteína (mg/dL)	glicose (mg/dL)	Bacteroscopia Gram
Normal	límpido incolor	RN até 20 < 1ano até 10 > 1ano até 5	15 - 50	45 - 100	negativo
Meningite bacteriana	turvo purulento	> 500 (neutrófilos)	> 100	< 50	positivo*
Meningite viral	límpido	até 500 (linfócitos)	normal	normal	negativo
Meningite por fungo	límpido	> 10 (linfócitos e monócitos)	aumentado	diminuído	positivo**
Meningite por parasita	turvo	500 – 2000 (eosinófilos)	aumentado	normal	negativo

*presença de cocos, diplococos, bacilos ou cocobacilos Gram-positivos ou Gram-negativos; ** presença de filamentos ou leveduras.

I. Acondicionamento, manuseio, manutenção e transporte de cultura bacteriana (cepa) de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*

A cultura bacteriana (cepa) deve ser encaminhada em meio apropriado, com crescimento bacteriano recente (18 a 24 horas) e adequadamente fechado. Conservar e transportar à temperatura ambiente em caixa isotérmica.

As bactérias (cepas), em especial as dos gêneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus*, são exigentes para o seu crescimento em cultura, sendo sensíveis às condições ambientais como temperatura e dessecação, portanto, é necessário cuidado quanto ao acondicionamento, manuseio, manutenção e transporte evitando-se assim contaminação e/ou inviabilidade das cepas bacterianas.

1. Acondicionamento e Manuseio

O manuseio das culturas bacterianas (cepas) deve obedecer às normas internacionais de biossegurança. Em sua maioria, estas bactérias são consideradas agentes infecciosos de Classe de Risco Biológico Nível 2 (NB-2), que corresponde a moderado risco individual e limitado risco para a comunidade. Entretanto, este risco é aumentado para os profissionais que manipulam rotineiramente isolados de *N. meningitidis* quando comparado ao risco da população em geral. Para estes profissionais estão indicadas as vacinas meningocócicas de acordo com o manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIES). A recomendação é que as cepas sejam manipuladas por profissionais treinados para o trabalho com agentes patogênicos; em cabines de segurança biológica NB-2 e com uso obrigatório de Equipamentos de Proteção Individual (EPI - luva, máscara e avental). As cabines de segurança biológica devem estar com a manutenção preventiva e/ou corretiva assegurada.

As bactérias mantêm sua viabilidade em meios de cultura adequados, e em 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 bacterianas devem ser repicadas após este período ou devem ser mantidas de forma congelada. Os meios de cultura mais utilizados são: ágar sangue de carneiro 5% ou ágar chocolate 5% para *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* e ágar chocolate 5% enriquecido para *H. influenzae*.

2. Manutenção

A melhor forma de garantir a viabilidade da cultura bacteriana (cepa) por período curto de armazenamento é o crescimento em meios de cultura sólido para o cultivo do agente à temperatura ambiente. Culturas em caldo não devem ser utilizadas, pois facilitam a contaminação, diminuindo a viabilidade da cepa. Para manter a viabilidade da cepa isolada por período prolongado a melhor forma é o congelamento. 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 bacterianas (cepas) devem ser transportadas em meios de cultura sólidos, adequados para cada espécie e sem refrigeração. Também podem ser utilizados meios de transporte como o AMIES com carvão ou sílica gel, pois mantêm a viabilidade bacteriana por uma semana. As culturas devem ser transportadas em repique recente, isto é, com crescimento de 18 a 24 horas. Deve-se evitar o transporte das cepas de forma congelada, mas se for este o transporte escolhido, assegurar gelo seco em quantidade suficiente para manter a baixa temperatura durante todo o transporte. Nunca transportar as culturas bacterianas de forma congelada em sangue ou outros meios líquidos não recomendados.

O empacotamento das 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 tubos e/ou placas com as culturas devem ser envoltos em papel absorvente, seguido de saco plástico, e colocados em recipiente resistente com tampa, que por sua vez deve ser colocado no recipiente de transporte de papelão. O papel absorvente que envolve o tubo ou placa deve ser suficiente para absorver o conteúdo completo do recipiente, caso este se rompa. Na caixa de transporte deve ser colocada uma etiqueta com o nome do laboratório de destino, endereço e a advertência de que se trata de material/agente biológico.

Todas as cepas devem ser transportadas acompanhadas de sua identificação de origem (nome do laboratório, cidade, nome do responsável pelo envio, informações para contato e outros) e dos dados demográficos do paciente (nome, idade, sexo, data da coleta do material, suspeita clínica, material clínico de isolamento, cidade de residência, medicação/antibióticos, vacinação quando disponível e outros). As culturas bacterianas (cepas) encaminhadas ao IAL sem identificação e informação do paciente tem seu valor epidemiológico comprometido.

II. Coleta e semeadura de amostras de lesão petequial destinadas à pesquisa de *Neisseria meningitidis*

1. Raspado da lesão

Fazer assepsia da pele no local da lesão petequial 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 de alginato de cálcio, todavia estas alternativas têm menor rendimento. Semear imediatamente, por esgotamento, o material coletado, em placa com ágar sangue de carneiro a 5% ou ágar chocolate a 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 petequial 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 ao líquido injetado. Dispensar o material aspirado imediatamente em placa com ágar sangue de carneiro a 5% ou ágar chocolate a 5% e, em seguida, estriar o material na placa com auxílio de uma alça bacteriológica descartável ou *swab* de rayon ou de 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.

III – Meningites por outras bactérias

Outras bactérias também podem causar meningite, entre elas se destacam: *Streptococcus spp* – especialmente espécies do grupo B (*pyogenes*); *Streptococcus agalactie*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus spp*; *Enterococcus spp*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter spp*; *Salmonella spp*; *Shigella spp*; *Escherichia coli*; *Proteus spp*; *Treponema pallidum*; *Leptospira spp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia spp*.

A coleta das amostras biológicas, líquido e/ou sangue e/ou outros, deve ser realizada preferencialmente antes da introdução do antibiótico. A cultura permite realizar o teste de sensibilidade aos antibióticos e a partir do isolamento da cepa é possível identificar o gênero/espécie da mesma. Amostras de sangue devem ser semeadas imediatamente no frasco de hemocultura adequado para idade (pediátrico ou adulto).

O acondicionamento, manuseio, manutenção e transporte dessas bactérias podem ocorrer conforme as orientações descritas para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, levando em consideração as características de crescimento e meios de cultura específicos para cada uma delas, assim como a classe de Risco Biológico que passa de Nível 2 para Nível 3 (NB-3) quando se tratar de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os meios de cultura mais utilizados para transporte dessas bactérias são: ágar Nutriente, Cary Blair ou similar para *Listeria monocytogenes*; ágar BHI, Tryptic Soy ou similar para *Staphylococcus spp* e *Enterococcus spp*; ágar Nutriente, MacConkey ou similar para *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *Escherichia coli*; ágar sangue ou chocolate para *Streptococcus agalactie* ou *pyogenes*; Lowenstein-Jensen (LJ) ou meios comerciais para *Mycobacterium tuberculosis*; Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) para *Leptospira spp* e meio BHI para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia spp*.

IV. Coleta e semeadura de amostras destinadas à pesquisa de Micobactérias

1. Pesquisa direta

Líquor – preparar o esfregaço em lâmina e, para o exame direto, utilizar a coloração de Ziehl Neelsen. Seguir as orientações de semeadura e incubação descritas no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (vide referências).

2. Pesquisa por cultura

Líquor - coletar um volume mínimo de 5 mL em tubo de polipropileno estéril com tampa bem fechada. Conservar e transportar em temperatura ambiente em caixa isotérmica.

Sangue - coletar 3 a 5 mL com assepsia e semear imediatamente no frasco de hemocultura adequado para idade (pediátrico ou adulto). Conservar e transportar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz em caixa isotérmica.

V – Coleta, semeadura e transporte de amostras destinadas à pesquisa de Leptospiras

1. Pesquisa por cultura

Realizar a coleta de líquido e/ou sangue preferencialmente antes da administração de antibióticos e até o 7º dia após o início dos sintomas.

Líquor – coletar no mínimo 1 mL em tubo estéril ou semear assepticamente 0,5 mL da amostra em tubo com meio de cultura semissólido para leptospira. Conservar e transportar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e em caixa isotérmica.

Sangue – coletar e semear no momento da coleta, assepticamente, em dois tubos com meio de cultura para leptospira. Um tubo com 1 gota de sangue e o outro com 2 gotas de sangue. Conservar e transportar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e em caixa isotérmica. O meio de cultura para leptospira EMJH pode ser retirado no laboratório de Leptospirose do Centro de Bacteriologia do IAL de São Paulo.

2. Pesquisa de anticorpos anti-leptospira pelo teste de aglutinação microscópica (MAT)

Líquor - coletar 1 a 3 mL em tubo estéril. Conservar em geladeira e transportar entre 2°C a 8°C com gelo reciclável em caixa isotérmica..

Soro - coletar sangue venoso em tubo estéril sem anticoagulante. Após obtenção de no mínimo 3 mL de soro, conservar em geladeira e transportar entre 2°C a 8°C com gelo reciclável em caixa isotérmica. Recomenda-se a coleta de amostras de soro pareadas, sendo a primeira no atendimento e a segunda com intervalo de 14 a 21 dias (máximo de 60 dias) após a primeira coleta.

VI. Coleta e semeadura de amostras destinadas à pesquisa de *Treponema*

Amostras de líquido, sangue (soro) e fragmentos de tecido para diagnóstico de neurosífilis consultar o manual eletrônico de exames do IAL.

VII. Coleta, armazenamento e transporte de amostras destinadas à pesquisa de *Rickettsias* (Febre maculosa)

Realizar a coleta da primeira amostra de sangue imediatamente após a suspeita clínica, preferencialmente antes da introdução do antibiótico. Embora apresente menor sensibilidade para o diagnóstico, nos casos suspeitos de encefalite por febre maculosa, uma amostra de líquido também poderá ser enviada juntamente com a amostra de soro.

1. Pesquisa de anticorpos por reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Coletar 5 mL de sangue em tubo sem anticoagulante, o soro será utilizado para o exame. Coletar a 1ª amostra de soro na fase aguda da doença (até 7 dias após o início dos sintomas) e a 2ª amostra a partir de 15 dias da primeira. Para envio imediato (até 6 horas) conservar em geladeira e após esse período o soro deve ser separado e conservado em freezer a -20°C, transportado em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, em quantidade suficiente para manter as amostras congeladas até a chegada ao laboratório. As amostras só serão processadas após o recebimento da 2ª amostra, quando em reação pareada buscar-se-á identificar a elevação de títulos de anticorpos específicos (2 títulos ou 4 vezes a diluição) entre a primeira e a segunda amostras.

Devido à janela imunológica, ou seja, o período após a infecção que o organismo leva para produzir concentrações de anticorpos detectáveis pela RIFI, a primeira amostra não será processada isoladamente, pois na maioria dos casos resultará em falso negativo prejudicando a avaliação do clínico e dos dados epidemiológicos sobre o agravo. Para este exame, os resultados da pesquisa de IgG são mais específicos do que a pesquisa de IgM, por esta razão só os anticorpos IgG são utilizados para o diagnóstico da febre maculosa.

2. Pesquisa por Imuno-histoquímica (IHQ)

A pesquisa de antígeno em fragmentos de tecido e órgãos é realizada por meio da imunoperoxidase, e os resultados consistem na demonstração positiva de antígenos em

células endoteliais de amostras de biópsia ou autópsia em cortes de tecido parafinado, associados à lesão endotelial com espectro de lesão da pele variando desde infiltrados linfomononuclear até quadros de intensa vasculite leucoclastica.

Os fragmentos de tecido (pele, fígado e/ou pulmão), de aproximadamente 1,5cm³, devem ser acondicionados em frasco individual de boca larga (tipo coletor universal) contendo solução fixadora, formalina 10% ou formalina tamponada no volume de 20 vezes o volume do fragmento. Identificar o frasco com nome do paciente e local do fragmento coletado. Conservar e transportar em temperatura ambiente em caixa isotérmica em até 48h. Evitar temperaturas acima de 40°C.

3. Pesquisa por qPCR

Para a febre maculosa este exame é complementar à sorologia e exclusivo para casos de óbito. O exame é realizado na mesma amostra enviada para sorologia: primeira amostra de soro coletada na fase aguda da doença, não sendo necessário envio de uma alíquota específica para este exame.

O volume recomendado de amostra para este exame é 500µL, sendo o mínimo de 200µL. Nos casos onde a evolução para óbito ocorrer após o envio da amostra para a realização da sorologia, o solicitante deverá informar diretamente ao laboratório para que a amostra seja encaminhada para pesquisa por qPCR.

Excepcionalmente a pesquisa por qPCR poderá ser realizada para casos graves, com potencial risco de evolução para óbito impossibilitando a coleta da segunda amostra para o diagnóstico pela sorologia.

É importante lembrar que na pesquisa por qPCR para febre maculosa há possibilidade de resultados falso negativos devido ao curto período de bacteremia, assim quanto mais precoce for coletada a amostra para o diagnóstico, maiores são as possibilidades de detecção do agente etiológico. Por se tratar de uma bactéria intracelular obrigatória, o grau da lesão celular (vasculite) é diretamente proporcional à quantidade de riquétsias presente no sangue periférico, sendo esta uma das principais razões pela qual a qPCR está indicada somente para os casos de óbito.

4. Isolamento em cultura para riquetsias do grupo febre maculosa

Para este exame o IAL utiliza a metodologia chamada “shell vial” onde é possível identificar o padrão de crescimento característico das riquetsias no microscópio de fluorescência. Amostras de coágulo sanguíneo, autopsias (fígado, lesão cutâneas e sufusões hemorrágicas) e biópsias de pele (região cutânea exantemática ou local da picada do carrapato) podem ser enviadas ao IAL. A manipulação de riquetsias viáveis para replicação *in vitro* é um procedimento que exige nível de segurança biológico NB3.

As amostras para isolamento devem ser coletadas em condições de assepsia e acondicionadas em frascos estéreis criogênicos contendo meio de transporte BHI (Brain Heart Infusion, infusão de cérebro coração). Nunca deve ser enviado material para isolamento em tubo ou frasco de vidro. O armazenamento deve ser em freezer - 70°C e, o transporte pode ser em gelo seco ou nitrogênio líquido. As riquetsias são muito frágeis por isso, é muito importante sua conservação em temperaturas muito baixas até o processamento do exame.

O isolamento em cultura, assim como a qPCR são úteis nos casos graves ou óbito, quando a coleta de amostras clínicas ocorre na fase aguda da doença, situação em que ainda não há anticorpos detectáveis, porém, devido a intensa vasculite causada pelas riquetsias, ocorre riquetsemia, tornando possível o isolamento da bactéria em sangue periférico.

O resultado positivo no isolamento é conclusivo, porém o resultado negativo tem baixo valor preditivo negativo, por isso é necessário à confirmação pela sorologia pareada.

VIII. Acondicionamento, manuseio, manutenção e transporte de amostras destinadas à pesquisa por qPCR de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*

1. Tipo de amostra

As amostras apropriadas para pesquisa por qPCR são líquor 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, 500 µL. 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 20 a 50 mg (tamanho de um grão de feijão) é suficiente para as análises.

3. Manuseio

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 utilizada. 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 utilizar ponteiros descartáveis com bloqueio de aerossol. Caso não seja possível, utilizar pipeta Pasteur nova. Nunca utilizar material reciclado mesmo que esterilizado em autoclave. Não manipular as amostras destinadas a qPCR em áreas onde sejam realizadas culturas ou suspensões bacterianas.

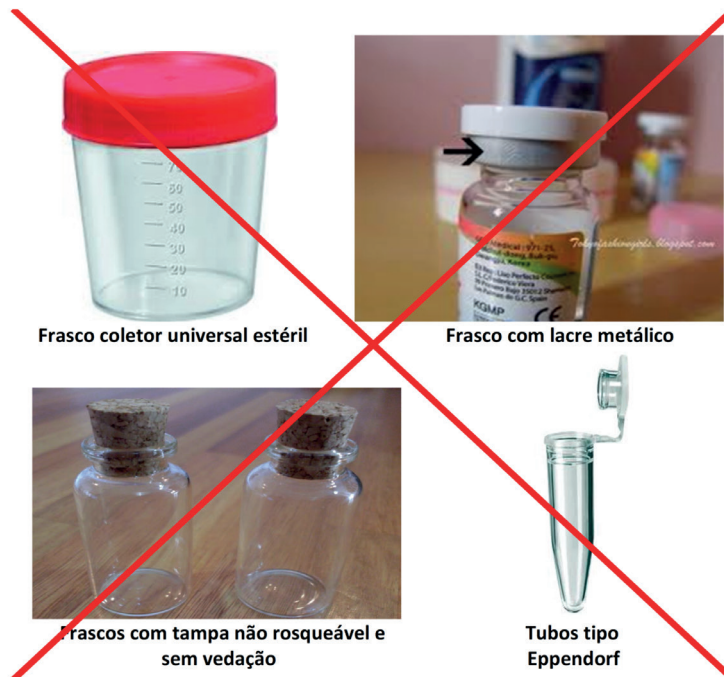
4. Acondicionamento

As amostras/alíquotas devem ser armazenadas obrigatoriamente em tubos novos, preferencialmente pequenos, com tampa de rosca com anel de vedação (criotubo), próprios para 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



Figura 2. Exemplos de frascos/tubos NÃO ADEQUADOS para o acondicionamento e transporte dos materiais biológicos.



Meningites Virais: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos/Liphaus BL et al.

5. Transporte e encaminhamento pelos IAL Regionais ao IAL São Paulo

As amostras devem ser previamente congeladas a -20°C e encaminhadas em gelo seco ou nitrogênio líquido preferencialmente, ou pelo menos, mantidas congeladas em caixa isotérmica com gelo reciclável para garantir a qualidade. 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 pelos LACENS ao IAL São Paulo

O transporte de amostras deve ser realizado em caixa própria para transporte de material biológico (UN3373) e seguindo as normas de biossegurança (Figura 3). As amostras devem ser encaminhadas ao Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas do IAL São Paulo em gelo seco para garantir sua qualidade.

7. Rejeição de amostras

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 ou todas sem identificação adequada (nome do paciente e tipo de amostra).

8. Tipo de material e coleta após o óbito

Os materiais/fragmentos aceitos para processamento e realização de qPCR são: encéfalo (preferencialmente meninges), e um órgão filtrante (baço ou fígado), 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 rapidamente, utilizando um frasco para cada fragmento de tecido, preferencialmente em até 2 horas e no máximo em até 8 horas após o óbito. 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.

Figura 3. Manuseio, acondicionamento e transporte de amostras biológicas em condições ideais para pesquisa por PCR em Tempo Real (qPCR).



Meningites Virais: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos/Liphaus BL et al.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Manual eletrônico de exames do Instituto Adolfo Lutz (IAL) - São Paulo. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/servicos/exames-amstras-biologicas>.
2. Laboratory biosafety manual, 4ed. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>.
3. Orientações para o transporte de artigos perigosos em aeronaves civis. Disponível em: <https://www.anac.gov.br/assuntos/legislacao/legislacao-1/boletim-de-pessoal/2015/21/anexo-ii-is-175-001c>.
4. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/299281330_Manual_Nacional_de_Vigilancia_Laboratorial_da_Tuberculose_e_outras_Micobacterias_Secretaria_de_Vigilancia_em_SaudeMSBrasil_2008.
5. Leptospirese: diagnóstico e manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leptospirese-diagnostico-manejo-clinico2.pdf>
6. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO, 2nd edition, 2011. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70765>.
7. Fluxo de encaminhamento de cepas de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* dos Laboratórios Locais para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacen e para o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo – Laboratório de Referência Nacional para as Meningites Bacterianas e Infecções Pneumocócicas Invasivas. Nota Informativa Nº 17/2019-CGLAB/DAEVS/SVS/MS.
8. Meningites. São Paulo (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Guia de Vigilância Epidemiológica. 1º ed. São Paulo: CVE, 2012, Caderno 3. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória, p.11-20.
9. Doença Meningocócica. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 4º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, capítulo 1, p.33-44.

Meningites Virais: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos/Liphaus BL et al.

10. Outras Meningites. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 4^o ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, capítulo 1, p.45-69.
11. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis, Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, 174p.
12. American Academy of Pediatrics. Meningococcal Infections. In: Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield K, Sawyer MH. eds. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 32nd ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2021:519-32.
13. American Academy of Pediatrics. *Haemophilus influenzae* Infection. In: Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield K, Sawyer MH. eds. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 32nd ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2021:345-54.
14. American Academy of Pediatrics. *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcal) Infections. In: Kimberlin DW, Barnett ED, Lynfield K, Sawyer MH. eds. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 32nd ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2021:713-27.
15. Gorla MC, Cassiolato AP, Pinhata JMW, Moraes C, Corso A, Gagetti P, Lemos AP. Emergence of resistance to ciprofloxacin in *Neisseria meningitidis* in Brazil. J Med Microbiol. 2018; 67(3):286-8.
16. Liphaut BL, Yu ALF, Ferreira PM, Endo JAG, Silva MR, Carvalhanas TRMP. Meningite: O que precisamos saber? (Meningitis: What do we need to know?). Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2018;15(178):23-32.
17. Liphaut BL, Okai MICG, Silva APD, Gorla MC, Fernandes MR, Pacola MR, Collucci MAF, Shinkai IAM, Higa FK, Catani CF, Marques EGL, Carvalhanas TRM. Outbreak of *Neisseria meningitidis* C in a Brazilian oil refinery involving an adjacent community. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(2):88-92.
18. Figueira GCN, Carvalhanas TRMP, Okai MIG, Yu ALF, Liphaut BL. Avaliação do sistema de vigilância das meningites no município de São Paulo, com ênfase para doença meningocócica. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2012; 9(97):5-25.
19. Salgado MM, Higa FT, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Liphaut BL, Oliveira, PL, Silva CN, Sacchi CT. Nova versão do ensaio da PCR em Tempo Real para o diagnóstico laboratorial

Meningites Virais: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos/Liphaut BL et al.

e vigilância epidemiológica das meningites bacterianas. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2012; 9(103):16-20.

20. Oliveira PL, Fukasawa LO, Salgado MM, Gonçalves MG, Higa FT, Araújo TP, Liphaut BL, Sacchi CT. Uso da Técnica de PCR em Tempo Real no Diagnóstico Etiológico das Meningites Bacterianas Associadas ao *Staphylococcus aureus*. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2012; 9(98):4-11.
 21. Carvalhanas TRMP, Liphaut BL, Pellini ACG, Yu ALF, Freitas GD, Ribeiro AF. Evaluation of bacterial meningitis Sentinel Surveillance Program (BMSSP) introduced in 2007 in São Paulo state, Brazil. Int J Inf Dis. 2011; 14(suppl):e277.
 22. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, Ribeiro AF, et al. and São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team. Incorporation of real-time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil. *PlosOne* 2011;6:1-6, e20675.
 23. Carvalhanas TRMP, Brandilione MCC, Zanella RC. Meningites bacterianas. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) 2005; 2(17):1-13.
-

Correspondência para/Correspondence to:

Bernadete L. Liphaut

E-mail: dvresp@saude.sp.gov.br

Meningites Virais: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos/Liphaut BL et al.