

## Contribuição de amostras de sangue no diagnóstico laboratorial da doença meningocócica

### Contribution of blood samples in laboratorial diagnosis of meningococcal disease

Maria LOPES<sup>1\*</sup>  
Sandra I. S. dos SANTOS<sup>1</sup>

RIALA6/917

Lopes, M.; Santos, S. I. S. dos Contribuição de amostras de sangue no diagnóstico laboratorial da doença meningocócica . **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(1):45-49, 2002

**RESUMO.** Foram estudados retrospectivamente 73 casos de doença meningocócica (DM), dos quais, analisou-se amostras de líquido céfalo-raquídeo (LCR) e de sangue, empregando-se as técnicas de cultura e pesquisa de antígenos polissacarídicos, através da contraímuno-eletoforese (CIE) e pela reação de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas por antissoros específicos (LA). Os resultados laboratoriais revelaram que 45,2% das amostras foram positivas através da análise do LCR; 41,0% foram positivas pela análise do LCR, hemocultura e/ou soro e 13,6% foram positivas através da análise de hemocultura e/ou soro. Quanto ao tipo de exame realizado com o sangue, notou-se que 35,2% dos casos foram positivos pela hemocultura, e quando se pesquisou o antígeno no soro dos pacientes, obteve-se 24,6% de positividade pela CIE e 46,7% pelo LA. Constatou-se que 13,6% dos casos, só tiveram a confirmação laboratorial, através dos exames realizados em amostras de sangue, destacando-se assim, a importante contribuição desse tipo de material na identificação do agente etiológico e no aumento da positividade do diagnóstico laboratorial da DM.

**PALAVRAS CHAVE.** . aglutinação de látex; hemocultura; contraímuno-eletoforese; doença meningocócica; diagnóstico laboratorial.

<sup>1</sup> Seção de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Taubaté

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Taubaté  
Pça Cel. Vitoriano, 23 - CEP 12020-020 - Taubaté - SP e-mail: ialtaub@ig.com.br

## INTRODUÇÃO

A doença meningocócica (DM) foi descrita em 1805, em decorrência a um surto ocorrido em Genebra na Suíça, porém o agente etiológico, a bactéria *Neisseria meningitidis* ou meningococo, só foi identificado em 1887<sup>16</sup>.

Esse agente pode infectar de forma aguda o organismo humano, atingindo principalmente crianças com menos de cinco anos ou adultos jovens, levando a um quadro de meningite, que é a forma sintomática mais freqüente. Por outro lado, a meningococemia pode acompanhar a meningite ou se manifestar de maneira fulminante sem o envolvimento das meninges<sup>11,13</sup>.

Assim, a DM é confirmada quando, além do diagnóstico clínico, forem realizados exames laboratoriais para o isolamento da bactéria *Neisseria meningitidis* em líquido céfalo-raquídeo (LCR) e/ou sangue ou na detecção de antígenos meningocócicos no LCR e/ou soro, através dos testes de contraímuno-elektroforese (CIE) e de látex<sup>12</sup>.

O diagnóstico laboratorial realizado com o LCR e sangue, além de confirmar o diagnóstico clínico, tem também relevante importância epidemiológica, pois permite a identificação do sorogrupo prevalente numa população e conseqüentemente oferece subsídios para sua profilaxia, e ainda, possibilita a classificação da DM direcionada ao sistema da Vigilância Epidemiológica<sup>5,12</sup>.

Desse modo, o escopo do presente trabalho foi demonstrar o incremento do diagnóstico laboratorial da DM, obtido pela utilização de amostras de sangue, empregando-se para esse fim, a hemocultura e/ou reações imunológicas no soro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados retrospectivamente e caracterizados por um ou mais métodos laboratoriais, 73 casos de DM, provenientes de cidades do Vale do Paraíba e Litoral Norte/SP e que foram encaminhados ao Setor de Bacteriologia do Laboratório I do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Taubaté, no período de 1996 a 2000

### 1. Métodos Laboratoriais

#### 1.1. Cultura de líquido céfalo-raquídeo

Foram semeadas 5 a 10 gotas da amostra em agar Müeller-Hinton chocolate 5% (sangue de carneiro), incubando-se o material em atmosfera e umidade de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> à 35-37°C por 24-48 horas. Para a identificação da bactéria, após seu isolamento, procedeu-se a bacterioscopia pelo método de Gram modificado por Hucker; prova de oxidase; utilização de carboidratos (dextrose, maltose, lactose e sacarose) e aglutinação em lâmina com os soros aglutinantes anti-meningococo grupo específico. Foram considerados positivos, os casos em que se observaram bactérias com morfologia de

diplococos gram-negativos, tendo prova de oxidase positiva, utilizando dextrose e maltose e aglutinando com um dos soros específicos A, B ou C<sup>7</sup>.

#### 1.2. Hemocultura

O sangue coletado no momento da internação foi semeado imediatamente em meio de cultura "Probac" numa quantidade correspondente a 10% do volume do meio e incubado à 35-37°C. Sub-culturas foram realizadas após 24 horas a 7 dias de incubação em agar Müeller-Hinton chocolate 5% (sangue de carneiro) e para as sub-culturas positivas, usaram-se as mesmas técnicas de identificação preconizadas pelo Ministério da Saúde<sup>7</sup> para a cultura de LCR.

#### 1.3. Contraímuno-elektroforese

A pesquisa de antígenos no líquido céfalo-raquídeo e soro por esse método foi realizada em fita de acetato de celulose, usando tampão TRIS em pH 8,6, empregando-se força iônica igual a 0,113; 0,05 M com a fonte ajustada para 30 mA e a corrida marcada para 10 minutos. Posteriormente, a fita foi lavada com solução fisiológica a 0,85%, durante 1 hora, seguida da coloração com Ponceau S durante 5 minutos e descoloração com ácido acético a 5% para a leitura da corrida eletroforética. Os antissoros aglutinantes e precipitantes de anti A, B, C e antígenos específicos foram fornecidos pelo Instituto Adolfo Lutz Central - São Paulo.

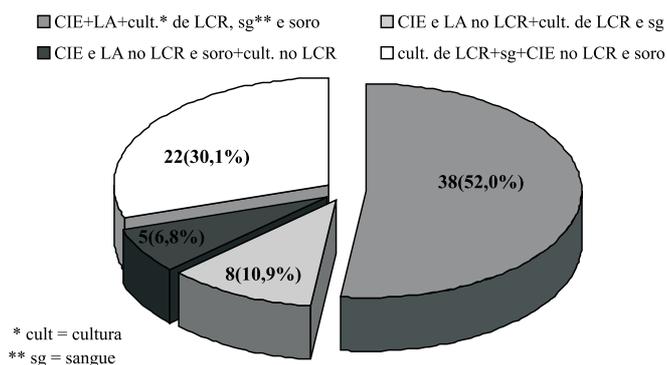
#### 1.4. Teste de Aglutinação de látex

Para a pesquisa de antígenos de meningococo no LCR e soro, empregou-se o *kit* (Slidex meningite-*kit* 5 Biomérieux) seguindo-se as normas do fabricante. O princípio do método baseia-se na aglutinação em lâminas, quando se aplica sobre o material biológico estudado, reagentes contendo partículas de látex sensibilizadas por antissoros específicos A, B e C.

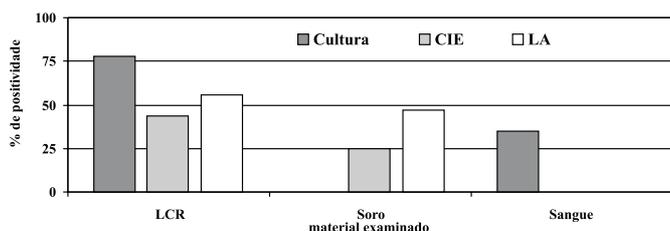
## RESULTADOS

Verificou-se que em 38 (52,0%) casos foram encaminhadas amostras de LCR, hemocultura e soro, nas quais, foram processadas todas as provas laboratoriais descritas. Em 5 (6,8%) casos, não foram encaminhadas amostras de hemocultura. De 8 (10,9%) pacientes não foram enviadas amostras de soro. Em 22 (30,1%) casos que foram positivos na cultura de LCR, não foi realizado o teste de látex no soro e/ou LCR por falta de reagentes ou insuficiência de material (figura 1).

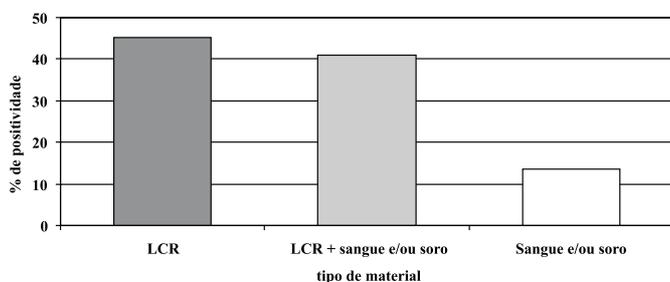
Analisando individualmente os exames realizados em cada tipo de material encaminhado ao laboratório, observa-se na figura 2 que a positividade da cultura de LCR foi de 78,0% (57/73), do LA 55,7% (39/70) e da CIE 43,8% (32/73). No soro, constatou-se que 24,6% (16/65) das amostras foram positivas na CIE e 46,7% (20/43) na LA. Do total de hemoculturas realizadas, 35,2% (24/68) foram positivas.



**Figura 1.** Distribuição do número e percentual das análises realizadas nos 73 casos de DM no Laboratório I de Taubaté no período de 1996 a 2000.



**Figura 2.** Distribuição do percentual de positividade de DM, segundo o tipo de material examinado e o método laboratorial empregado. IAL-Taubaté, 2002.



**Figura 3.** Distribuição do percentual da positividade obtida nos 73 casos de DM, segundo o tipo de material analisado. IAL-Taubaté, 2002.

Considerando-se os 73 casos estudados, a figura 3 mostra que 33 (45,2%) foram positivos só no LCR; 30 (41,0%) no LCR e na hemocultura e/ou soro; 10 (13,6%) foram positivos apenas na hemocultura e/ou soro.

Em relação aos sorogrupos de *N. meningitidis* identificados nos 73 casos estudados, constatou-se que 32 (43,8%) eram do sorogrupo B e 41 (56,1%) do sorogrupo C.

## DISCUSSÃO

Embora o Centro de Referência Nacional para Meningites/IAL e Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo preconizem a coleta do LCR, sangue para hemocultura e soro para o diagnóstico de DM, verificamos em nosso estudo que nem todas as amostras foram encaminhadas pareadas (figura 1). No entanto, ressaltamos que, quando foi possível a realização de qualquer uma das provas laboratoriais usando o sangue como material, houve um acréscimo na obtenção do diagnóstico da DM (figura 3).

Os exames realizados no LCR revelaram que a positividade maior foi obtida na cultura com 78,0%, seguida da LA com 55,7% e de 43,8% na CIE (figura 2). Esses dados são semelhantes aos descritos por Rocha *et al.* (1999)<sup>10</sup> que confirmaram uma positividade de 87,4% na cultura de LCR e 54,8% na CIE, afirmando que, apesar das dificuldades da coleta, transporte e semeadura do LCR na cultura, essa teve um ótimo desempenho, considerando-se a proposta da melhoria do diagnóstico das DM. Por outro lado, os mesmos autores afirmam que a menor positividade da CIE pode estar associada à menor quantidade de antígeno bacteriano no início da doença e mais especificamente, em relação ao sorogrupo B, por problemas relativos à pouca imunogenicidade daquele polissacarídeo bacteriano. Kemp *et al.* (1998)<sup>5</sup> obtiveram percentuais mais baixos de positividade na cultura de 61,5% e 38,8% na CIE. Amostras de LCR analisadas através LA por Weiss *et al.* (2001)<sup>15</sup>, revelaram um percentual de apenas 3,8% de positividade, enquanto Alkmin *et al.* (1995)<sup>1</sup>, em estudo avaliando o teste de látex comparado a outras metodologias empregadas relatam 5,2% de positividade no teste para *N. meningitidis* C e 23,4% para *N. meningitidis* B, valores superiores aos percentuais encontrados na cultura e dessa forma referendando a aplicação do teste por sua simplicidade e rapidez.

Quanto à positividade nas amostras de soro, observou-se um percentual de 24,6% na CIE, valor esse, superior aos 12,0% descrito por Alkmin *et al.* (1996)<sup>2</sup> num estudo de avaliação da eficiência das técnicas empregadas para o diagnóstico laboratorial das infecções meningocócicas do grupo B. Já na técnica do LA, a positividade de 46,7% pode ser comparada aos valores referidos por Requejo *et al.* (1995)<sup>9</sup>, em pesquisa testando a sensibilidade das técnicas do LA e CIE, na qual os autores obtiveram respectivamente, uma positividade em amostras de soro de  $40,8 \pm 8,8$  e  $20,8 \pm 7,3$ , resultando em índices compatíveis aos do presente trabalho.

Observamos que o percentual de positividade obtido nas hemoculturas foi de 35,2%, percentual esse mais alto do que aquele verificado no estudo realizado por Ragunathan *et al* (2000)<sup>8</sup> que foi de 22,0% e por Weiss *et al.* (2001)<sup>15</sup> que foi em torno de 15,0%, porém mais baixo que o valor de 98,0% encontrado em trabalho similar descrito por Kuppermann *et al* (1999)<sup>6</sup>.

É sabido, segundo vários autores<sup>4, 9, 14</sup> que quando a coleta de sangue é feita fora do período de maior concentração de microorganismos circulantes, há dificuldade na recuperação das bactérias através da cultura. Já em relação às reações imunológicas, pequenas quantidades de antígenos circulantes são suficientes para se obter a positividade, mesmo nos pacientes em tratamento com antimicrobianos.

Verificou-se nesse trabalho que amostras de sangue exclusivamente contribuíram com 13,6% para o diagnóstico da DM, como mostra a figura 3. Carrol *et al.* (2000)<sup>3</sup> em trabalho realizado comparando técnica molecular com a hemocultura, revela que 9,0% dos casos suspeitos de DM só foram

confirmados através da hemocultura, enfatizando a importância do emprego de técnicas associadas para incrementar o diagnóstico laboratorial da DM.

Em relação aos sorogrupos identificados de *Neisseria meningitidis*, houve maior ocorrência do sorogrupo C, seguido do sorogrupo B nas amostras estudadas, o que evidencia a tendência do aumento desse sorogrupo já discutido por Rocha *et al.* (1999)<sup>10</sup>.

Desta forma, fica evidente a importância da contribuição do sangue para incrementar o diagnóstico laboratorial da DM, bem como o uso de métodos laboratoriais associados.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à pesquisadora Marilu Mendes Moscardini Rocha pela leitura do texto e pelas sugestões recomendadas.

RIALA6/917

Lopes, M.; Santos, S. I. S. dos. Contribution of blood samples in laboratorial diagnosis of meningococcal disease . **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(1):45-49, 2002

**ABSTRACT.** 73 cases of meningococcal disease (MD) have been studied retrospectively in which samples of cerebrospinal fluid (CSF) and blood were analysed using culture and meningococcal antigen detection through counterimmunoelectrophoresis (CIE) and reaction of latex agglutination (LA). The laboratory results showed that 45,2% of the samples were found positive in the CSF alone; 41,0% in the CSF, blood culture and/or serum, and only 13,6% in the blood culture and/or serum. As for the type of test carried out in the blood, it was observed that 35,2% of the cases were positive in the blood culture, while the tests of antigen detection in the serum, showed that 24,6% were positive by CIE and 46,7% by LA. It was noticed that 13,6% of the cases only had the laboratorial confirmation through blood samples, thus showing the important contribution of the blood in the identification of the ethiological agent and the increase of the positivity of MD laboratorial diagnosis.

**KEY WORDS.** latex agglutination; blood culture; counterimmunoelectrophoresis; meningococcal disease; laboratorial diagnosis.

#### REFERÊNCIAS

1. Alkmin, M.G.A.; Landgraf, F. I. M.; Melles, C.E.A. Avaliação do teste de látex comparativamente à cultura e a imunoelctroforese cruzada no diagnóstico de meningites bacterianas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 55 (1): 19-24, 1995.
2. Alkmin, M.G.A.; Landgraf, F. I. M.; Vieira, M. F. P. Contribuição da imunoelctroforese cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ ou soro no diagnóstico de infecções por *Neisseria meningitidis* grupo B no Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56 (1): 13-17, 1996.
3. Carrol, E. D. et al. Performance characteristics of the polymerase chain reaction assay to confirm clinical meningococcal disease. **Arch. Dis. Child.**, 83: 271-273, 2000.
4. Kellogg, J. A.; Manzella, J P.; Bankert, D. A. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. **J. Clin. Microbiol.**, 38(6): 2181-2185, 2000
5. Kemp, B.; Rocha, M.M.M.; Iversson, L.B. Avaliação do diagnóstico laboratorial da doença meningocócica em pacientes internados em um hospital sentinela do município de Campinas/SP, 1988-1991. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 57(1): 13-19, 1998.
6. Kuppermann, N. et al. Clinical and hematologic features do not reliably identify children with unsuspected meningococcal disease. **Pediatrics**, 103(2):201-206, 1999.
7. Ministério da Saúde. Secretaria de Ações Básicas da Saúde. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas**. Brasília; 1986.

8. Rangunathan, L. et al. Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: Report of a 1997 Survey. **J.Infec.**, 40: 74-79, 2000.
9. Requejo, H. I. Z.; Nascimento, C. M. P. C.; Fahrat, C. K. Detecção de antígenos em soros sanguíneos de crianças com meningite bacteriana. **Laes-Haes**, 94: 48-60, 1995.
10. Rocha, M.M.M. et al. Avaliação do diagnóstico laboratorial da doença meningocócica pelos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1): 33-39, 1999.
11. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância Epidemiológica**. São Paulo, 1995. (Doença Meningocócica-Normas e Instruções).
12. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação dos Institutos de Pesquisa. Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. **Meningites-Manual de Instruções, Critérios de Confirmação e Classificação**. São Paulo, 2001.
13. Van Deuren, M.; Brandtzaeg, P.; Van Deer Meer, J. W. M. Update on meningococcal disease with emphasis on patogénesis and clinical management. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13 (1): 144-166, 2000.
14. Vieira, M.F.P. et al. Bactéria do gênero *Haemophilus* isoladas de sangue e identificadas na Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, no período de 1979 a 1991. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 54(2): 88-92, 1994.
15. Weiss, D. P. L.; Coplan, P.; Guess, H. Epidemiology of bacterial meningitis among children in Brazil, 1977-1998. **Rev. Saúde Pública**, 35(3): 249-255, 2001.
16. World Health Organization. **Meningococcal Disease: Public Health Burden and Control**. Disponível em <URL: <http://www.who.int/emc/disease/meningitis/index.htm> > [2001, nov].

Recebido em 20/06/2002 ; Aprovado em 01/10/2002