

Investigação de meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil, utilizando métodos laboratoriais convencionais

Investigation of meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae in Ribeirão Preto, SP, Brazil, using conventional laboratory methods

Daniel Laguna Meirelles; Paulo da Silva; Jaqueline Otero Silva; Ana Maria Machado Carneiro; Marta Inês Cazentini Medeiros

Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, Brasil

RESUMO

A meningite é uma doença que acomete as populações de diferentes partes do mundo, sendo caracterizada como um importante problema de saúde pública. O objetivo deste estudo foi avaliar a positividade para *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* utilizando diferentes métodos convencionais de diagnóstico laboratorial. O estudo incluiu os casos suspeitos de meningite bacteriana diagnosticados no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, ocorridos no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2009. Foram analisadas 1.722 amostras utilizando, individualmente ou associados, os métodos de bacterioscopia, cultura de líquido cefalorraquidiano (LCR), hemocultura e/ou reação de contraímunoeletroforese. Entre as amostras analisadas, 392 (22,76%) apresentaram positividade para algum agente bacteriano em pelo menos um dos métodos utilizados. Dessas, 17,35% foram positivas para *N. meningitidis*, 15,82% para *S. pneumoniae* e 2,04% para *H. influenzae*. O fenótipo C: 23: P1.14-6 de *N. meningitidis* foi o mais prevalente, seguido do B: 4,7: P1.19,15. Os sorotipos 14, 3, 12F, 23F, 19F e 6B de *S. pneumoniae* foram os mais encontrados. O estudo concluiu que todos os métodos de diagnóstico laboratorial utilizados são complementares e nenhum deles deve ser negligenciado. A cultura continua sendo considerada o padrão ouro para o diagnóstico da meningite bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: Meningite bacteriana. Diagnóstico. Métodos clássicos. *Neisseria meningitidis*. *Streptococcus pneumoniae*. *Haemophilus influenzae*.

Nota: Artigo extraído do trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Programa de Aprimoramento Profissional (Fundap) – Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. Título do trabalho: "Meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* identificada por métodos laboratoriais clássicos, na região de Ribeirão Preto, no período de 2007 a 2008". Data da apresentação: fevereiro/2010.

ABSTRACT

Meningitis is a disease that affects people in different parts of the world, characterizing an important public health problem. This study is designed to evaluate the positivity of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, using different conventional methods of laboratory diagnosis. The study included all suspected cases of bacterial meningitis diagnosed at the Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, S.P., Brasil, during the period comprised between January, 2007 and December, 2009. A total of 1.722 samples was performed using either alone or associated with the conventional methods as Gram stain, Cerebrospinal Fluid Culture, blood culture and/or counterimmunoelectrophoresis. Among the analyzed samples, 392 (22.76%) presented positivity for some bacterial agent, in at least one of the methods used. Of these, 17.35% were positive for *N. Meningitidis*, 15.82% for *S. pneumoniae* and 2.04% for *H. influenzae*. Phenotype C: 23: P1.14-6 of *N. meningitidis* was the most prevalent, followed by phenotype B: 4, 7: P1.19,15. Serotypes 3, 9V, 12F, 14, 23F, 19F and 6B of *S. pneumoniae* were the most common. The study concluded that all diagnostic methods used were complementary, so neither should be neglected. The Cerebrospinal Fluid Culture or blood culture continues being considered the gold standard for bacterial meningitis diagnosis.

KEY WORDS: Bacterial meningitis. Diagnosis. Classical methods. *Neisseria meningitidis*. *Streptococcus pneumoniae*. *Haemophilus influenzae*.

INTRODUÇÃO

Meningite é um processo inflamatório que acomete as meninges e pode ser de etiologia infecciosa ou não. O processo não infeccioso pode estar relacionado a vários fatores, como hemorragia subaracnóidea, neoplasias primárias ou secundárias do sistema nervoso central (leucemia, tumores), distúrbios metabólicos etc. O processo de origem infecciosa pode ser causado por grande variedade de microrganismos, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas.¹ Esses microrganismos são de distribuição e predominância variadas, dependendo das características particulares de cada região.

Os casos de meningite são de abrangência mundial, o que a caracteriza como um importante problema de saúde pública, podendo sua letalidade atingir até 70% nas formas graves, sendo comum a ocorrência de sequelas neurológicas.²

Os casos de meningite bacteriana apresentam distribuição global, podendo ocorrer surtos ocasionais e epidêmicos em qualquer país do mundo. Ocorrem de forma endêmica em todos os continentes, inclusive em países desenvolvidos. Mas, a frequência é inversamente proporcional à situação socioeconômica e à idade.³

Do ponto de vista de saúde pública, os casos de meningite causados por bactérias e vírus são considerados os mais importantes, devido à sua alta ocorrência e potencial de produzir surtos epidêmicos.¹

Neisseria meningitidis (N.M.), *Haemophilus influenzae* (H.I.) e *Streptococcus pneumoniae* (S.pn) são os principais agentes etiológicos de meningite bacteriana notificáveis em nível nacional. Esses agentes etiológicos geralmente estão presentes nas narinas e no sistema respiratório do ser humano, podendo ser responsáveis por mais de 80% dos casos de meningites bacterianas fatais.⁴ A transmissão ocorre por contato direto, pessoa a pessoa, através da disseminação de gotículas, contato oral ou por objetos recém-contaminados com secreções das vias respiratórias do portador assintomático ou do doente.⁵

Essas bactérias são capazes de escapar à fagocitose, sobretudo pela presença de cápsulas polissacarídicas, que aumentam sua virulência, tornando-as muito invasivas. As cepas de *N. meningitidis* são classificadas em 12 sorogrupos, de acordo com o antígeno polissacarídeo presente na cápsula bacteriana,⁶ sendo os sorogrupos A, B, C, W135 e Y os mais frequentes. Podem ainda ser classificadas em sorotipos e sorosubtipos, de acordo com os antígenos protéicos presentes na parede externa da bactéria. As cepas de *S. pneumoniae* são classificadas em mais de 90 sorotipos capsulares, enquanto as de *H. influenzae* são classificadas em 6 sorotipos (a, b, c, d, e, f), a partir da diferença antigênica da cápsula polissacarídica.¹

Todos os casos de meningite bacteriana devem ser considerados como emergências médicas e, por esse motivo, é necessário iniciar o tratamento antes mesmo de conhe-

cer o agente etiológico. Porém, a identificação laboratorial da etiologia bacteriana da meningite aguda é essencial para a implantação de antibioticoterapia adequada e da quimioprofilaxia dos contatos.^{7,8}

Em relação às meningites bacterianas, este estudo é relevante devido à necessidade de identificar os principais agentes etiológicos causadores dessa doença, auxiliando na escolha de tratamentos e vacinas eficazes que permitam o controle efetivo do agravo.

O objetivo do estudo foi avaliar a prevalência de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, verificando a positividade de cada um dos agentes etiológicos nos diferentes métodos clássicos de diagnóstico laboratorial.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2009, no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL-RP) – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) –, foram investigadas 1.722 amostras, incluindo líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue e cepas bacterianas recebidas de outros laboratórios locais, para identificação. Todas as amostras foram provenientes de casos suspeitos de meningite bacteriana de pacientes internados em hospitais das regiões de Ribeirão Preto, Franca, Barretos e Araraquara. Os métodos utilizados (bacterioscopia e cultura do LCR, hemocultura e/ou contraímunoelctroforese) foram realizados de acordo com metodologia descrita no manual sobre meningite do Ministério da Saúde.⁹ A sorotipagem de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* foi realizada no Instituto Adolfo Lutz Central

(São Paulo). Ressalte-se que nem todas as amostras foram submetidas a todos os métodos de diagnóstico citados.

RESULTADOS

Das 1.722 amostras investigadas, 392 resultaram positivas para algum agente bacteriano (Figura 1), entre os quais 68 *N. meningitidis*, 62 *S. pneumoniae* e 8 *H. influenzae*. Analisando os métodos de diagnóstico isoladamente, observa-se que os três agentes etiológicos foram diagnosticados com melhor eficiência através de cultura (Figura 2).

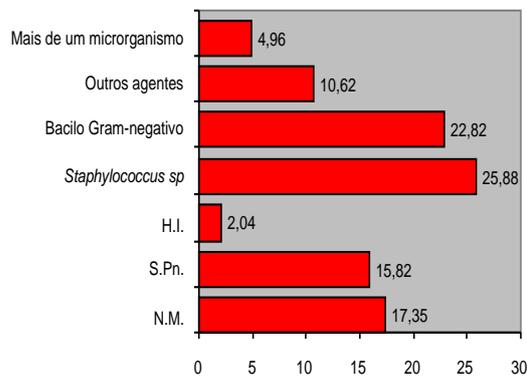
Os isolados de *N. meningitidis* foram identificados como pertencentes aos sorogrupos C (80,60%) e B (19,40%), com predominância do fenótipo C: 23 P1.14-6, seguido por B: 4,7 P1.19,15.

Entre os isolados de *S. pneumoniae* os sorotipos 14 (11,29%), 3 (9,68%), 12F

(9,68%), 23F (8,06%), 19F (8,06%) e 6B (6,45%) foram os mais frequentes e os 46,77% restantes apareceram distribuídos entre vários outros sorotipos.

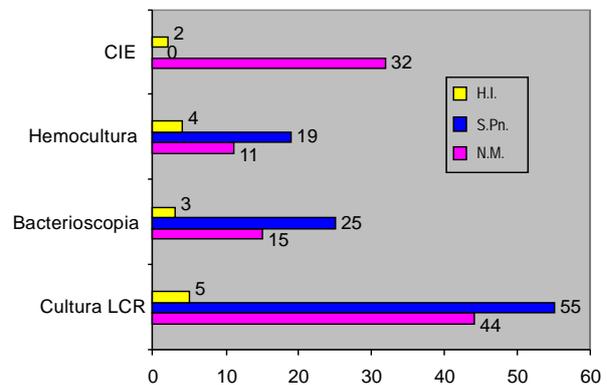
Dos 8 isolados de *H. influenzae*, 4 pertenciam ao biotipo II, entre os quais 2 foram positivos para o sorotipo a, 1 sorotipo b e outro negativo para qualquer sorotipo. Os quatro restantes foram determinados como *H. influenzae* biotipo I sorotipo b, *H. influenzae* biotipo V, *H. influenzae* biotipo III e um *H. influenzae* não encapsulado.

Verificou-se que 60% dos casos de meningite por *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* ocorreram entre pacientes do sexo masculino. A distribuição dos casos por faixa etária pode ser observada na Figura 3, enquanto a Tabela 1 mostra a associação dos diferentes métodos clássicos utilizados para o diagnóstico laboratorial de meningite bacteriana.



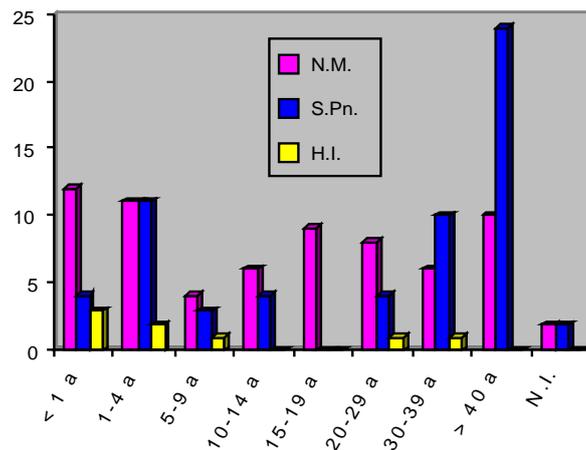
Investigação de meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil, utilizando métodos laboratoriais convencionais.

Figura 1. Distribuição dos isolados entre as 392 amostras positivas para meningite bacteriana.



Investigação de meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil, utilizando métodos laboratoriais convencionais.

Figura 2. Positividade dos diferentes métodos de diagnóstico, considerados isoladamente, em relação à *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.



Investigação de meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil, utilizando métodos laboratoriais convencionais.

Figura 3. Distribuição numérica dos casos de meningite por *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* quanto à faixa etária.

Tabela 1. Identificação da *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* pela bacterioscopia, cultura, hemocultura e contraímunoelctroforese, isoladamente e nas várias combinações.

Exames realizados	Agentes etiológicos identificados – Nº (%)			Total de exames positivos Nº (%)
	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	
Cult.	19 (27,94)	27 (43,55)	2 (25)	48 (34,78)
Hem.	6 (8,82)	7 (11,29)	3 (37,5)	16 (11,59)
CIE	18 (26,47)	NR	0	18 (13,04)
Cult. + hem.	2 (2,94)	3 (4,84)	0	5 (3,62)
Cult. + CIE	7 (10,29)	AI	0	7 (5,07)
Bact. + cult.	9 (13,23)	16 (25,81)	1 (12,5)	26 (18,84)
Bact. + cult. + CIE	4 (5,88)	AI	1 (12,5)	5 (3,62)
Bact. + cult. + hem.	0	9 (14,52)	0	9 (6,52)
Cult. + hem. + CIE	1 (1,47)	AI	0	1 (0,72)
Bact. + cult. + hem. + CIE	2 (2,94)	AI	1 (12,5)	3 (2,17)
Total dos casos	68 (49,27)	62 (44,93)	8 (5,80)	138 (100)

Bact. = bacterioscopia, CIE = contraímunoelctroforese, cult. = cultura de LCR, Hem. = hemocultura, NR = não realizada, AI = associação inexistente

DISCUSSÃO

Apesar dos esforços aplicados no desenvolvimento de medidas de vigilância para o controle de casos epidemiológicos de meningite bacteriana, estes ainda constituem um sério problema de saúde pública em todo mundo.² Observa-se uma grande incidência de casos em que a letalidade e as sequelas apresentadas pelos sobreviventes não devem ser menosprezadas.¹⁰

Os casos de meningite causados por *S. pneumoniae* ocupavam o segundo lugar, junto com os causados por *H. influenzae*, no período pré-vacina. Com a instituição da vacina para *H. influenzae* sorotipo b no calendário de vacinação, em 1999, esse quadro foi modificado.¹¹ Como demonstrado na Figura 1 e na Tabela 1, a incidência de meningite causada por *Haemophilus* foi

bem menor do que por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*, devido à eficácia da vacinação, fato observado também em outras regiões do Brasil^{12,13,14} e países da América latina.^{15,16}

Este estudo demonstra que a soma dos casos diagnosticados como *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* resultou em 35,21% do total de amostras positivas (Figura 1), diferindo de outros estudos^{8,10} que relatam cerca de 60% a 80% dos casos de meningite por esses agentes etiológicos. Ressaltamos que, pelo fato, dessas bactérias serem consideradas fastidiosas, a coleta, o manuseio, o encaminhamento da amostra e o uso prévio de antimicrobianos podem interferir no diagnóstico laboratorial.

A Figura 1 demonstra que houve uma predominância no isolamento de *Staphylococcus* sp e bacilos Gram-negativos. TONDELLA *et al.* (1989)¹⁷ afirmam que esses microorganismos são frequentemente apontados como agentes patogênicos oportunistas, especialmente nos casos de infecções hospitalares após intervenções cirúrgicas. No entanto, podem também estar relacionados à contaminação durante a coleta devido à manipulação inadequada, condições de armazenamento e encaminhamento das amostras.

Quanto à faixa etária (Figura 3), os casos de meningite por *N. meningitidis* foram predominantes em crianças com idade menor ou igual a 4 anos, coincidindo com relato de Castiñeiras *et al.* (2004).³ Dados da Funasa (2002)⁷ mostram que a meningite por *S. pneumoniae* é prevalente em adultos maiores de 50 anos – em nossa região encontramos resultados semelhantes. Embora de forma bastante diminuída, a meningite por *H. influenzae* ocorreu em

crianças menores de 9 anos, porém não em adultos. Esses resultados corroboram com outros, demonstrando também esta tendência em outras regiões do Brasil.⁷

Entre as quatro Divisões Regionais de Saúde (DRS) estudadas, 25 municípios contribuíram com nossos dados, sendo que a DRS de Ribeirão Preto enviou o maior número de amostras para o diagnóstico laboratorial. Isto pode ser explicado devido à proximidade geográfica com o laboratório, o que facilita o envio das amostras.

A cultura foi o método laboratorial que mais diagnosticou os casos suspeitos de meningite bacteriana (Tabela 1 e Figura 2), pois, além da sensibilidade deste método, este foi o exame mais utilizado para o diagnóstico.

No período estudado, 13,04% dos casos foram diagnosticados utilizando apenas a reação de CIE (Tabela 1). Entretanto, Fukasawa *et al.* (2010)¹¹ discutem as limitações da reação de contraímunoelutroforese quando comparada com a PCR, devido aos resultados falsos positivos que podem ocorrer, além de ser uma reação restrita para os sorogrupos A, B e C de *N. meningitidis* e o sorotipo b de *H. influenzae* e não diagnosticar *S. pneumoniae*.

Segundo CASTIÑEIRAS *et al.* (2004),³ os casos de doença meningocócica relatados no mundo são causados pelos sorogrupos A, B e C. De acordo com os dados da Organização Pan-Americana da Saúde,¹⁸ no Brasil ocorre prevalência do sorogrupo C. Na região estudada observamos resultado semelhante em relação ao sorogrupo C.

Embora o Centro de Referência Nacional para Meningites e o Instituto Adolfo Lutz e o Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, ambos órgãos do

Estado de São Paulo, preconizem a coleta do LCR e sangue para a realização do diagnóstico de meningite bacteriana, nem todas as amostras foram encaminhadas pareadas. LOPES e SANTOS (2002)¹⁰ demonstraram que, em alguns casos, o diagnóstico da doença é realizado somente através da cultura de sangue. Neste estudo observa-se que 11,59% dos casos foram diagnosticados apenas pela hemocultura (Tabela 1).

CONCLUSÃO

Entre os agentes bacterianos de interesse epidemiológico *N. meningitidis* foi prevalente na região estudada, com o

predomínio do sorogrupo C: 23: P1.14-6, seguido do B: 4,7: P1.19,15. O segundo agente mais isolado foi *S. pneumoniae*, com o sorotipo 14 sendo o mais isolado, seguido dos sorotipos 3, 12F, 23F, 19F e 6B, enquanto que *H. influenzae* foi o menos isolado.

Vale ressaltar que todos os métodos de diagnóstico utilizados são complementares e nenhum deles deve ser negligenciado. A cultura continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico da meningite, uma vez que ela permite o estudo epidemiológico dos isolados, sendo essa caracterização fenotípica fundamental para determinar estratégias de controle e prevenção da doença.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília, 2005; Secretaria de Vigilância em Saúde.
2. Lemos APS. Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C, grande São Paulo, 1990 a 2003. São Paulo. (Tese de Doutorado). São Paulo: Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2005.
3. Castiñeiras TMPP, Pedro LGF, Martins FSV. Doença meningocócica. base de dados na internet. Rio de Janeiro, 2004. [acesso em jan 2010]. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/DoençaMeningocócica>.
4. Trócoli MGC. Epidemiologia das meningites bacterianas e virais agudas ocorridas no Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS). 1998. (Dissertação de Mestrado). Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública; 1998.
5. Elias JRWP. Neisseria. In: Trabulsi LR. Microbiologia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005; p. 219-27.
6. Devoe IW. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. Rev Microbiol. 1992;46:162-90.
7. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 2002;577-632.
8. Gomes HR, Machado LR. Processos infecciosos do Sistema Nervoso. In: Nitrini RA. Neurologia que todo o médico deve saber. São Paulo: Atheneu, 2008; p. 205-11.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Normas técnicas para o diagnóstico das meningites bacterianas. Brasília, 1986; Centro de Documentação do Ministério da Saúde.
10. Guedes JS, Moraes JC. Epidemiologia da meningite por *Haemophilus influenzae*, no

- município de São Paulo, 1960-1977. Rev Inst Adolfo Lutz, 1989;49(2):219-29.
11. Fukasawa LO, Salgado MM, Gonçalves MG, Custódio AV, Araújo TP, Carvalhanas TRMP et al. Limitações no uso da técnica de contraímunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b. Bepa. 2010; 7(76):4-12.
 12. Perecin GEC, Bertolozzi MR. Meningites na Regional de Saúde de Piracicaba – 1992 a 2001: impacto da introdução da vacina contra o *Haemophilus influenzae* tipo b. Bepa. 2004;1(5).
 13. Takemura NS, Andrade SM. Meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b em cidades do estado de Paraná, Brasil. J. Pediatr. 2001;77(5):387-92.
 14. Miranzi SSC, Moraes SA, Freitas ICM. Tendência das meningites por *Haemophilus influenzae* tipo b no Brasil, em menores de 5 anos, no período de 1983 a 2002. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(5):473-7.
 15. Nascimento-Carvalho CM, Andrade AL. *Haemophilus influenzae* type b vaccination: long-term protection. J Pediatr. 2006; 82 (3 Suppl): S 109 –14.
 16. Laval CA, Pimenta FC, de Andrade JG, Andrade SS, de Andrade AL. Progress towards meningitis prevention in the conjugate vaccines era. Braz J Infect Dis. 2003;7:315-24.
 17. Tondella MLC, Tavares C, Buschinelli SSO, Casagrande ST, Brandileone MCC, Milagres LG. Utilização do meio de cultura Novobiocina-Nitrato-Sacarose (NNS) no diagnóstico presuntivo de *Staphylococcus saprophyticus*. Rev Inst Adolfo Lutz. 1989; 49(2):137-43.
 18. Organización Panamericana de la Salud - OPAS. Informe Regional de SIREVA II, 2007: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* em procesos invasores. Washington; 2008.
 19. Lopes M, Santos SIS. Contribuição de amostras de sangue no diagnóstico laboratorial da doença meningocócica. Rev Inst Adolfo Lutz. 2002;61(1):45-9.

Correspondência/Correspondence to:
Marta Inês Czentini Medeiros
Rua Minas, 877 – Campos Elíseos
CEP: 14085-410 – Ribeirão Preto/SP – Brasil
Tel: 55 16 36255046
E mail: micmedeiros@ial.sp.gov.br