

## CONTRAIMUNOELETROFORESE E HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA COMO MÉTODOS COMPLEMENTARES PARA O ESTUDO DA INFECÇÃO MENINGOCÓCICA

Carlos Emílio LEVY (1), João Carlos da COSTA (2) e Adhemar Mário FIORILLO (3)

### RESUMO

Analisamos 108 casos de meningite bacteriana, atendidos no Hospital das Clínicas da FMRP-USP, através da bacterioscopia do sedimento do líquido cefalorraquiano (LCR) corado pelo Gram, cultura do LCR em agar-chocolate, contraímuno-elektroforese (CIE) do LCR para pesquisa de polissacárides meningocócicos A e C, de hemófilos tipo b e de pneumococo com soro polivalente, hemocultura e hemaglutinação passiva (HP) para avaliar títulos de anticorpos antimeningocócicos A e C no soro. Embora nem todos os testes tenham sido aplicados simultaneamente, foram diagnosticados 71 casos de meningites meningocócicas (41 tipo A, 11 C, 2 A e C e 18 não tipadas), 9 por hemófilos tipo b, 6 por pneumococos, 2 por *E. aerogenes*, 1 por *Streptococcus* sp e 19 permaneceram sem diagnóstico etiológico. Isoladamente, a HP revelou o maior índice de positividade, enquanto que os métodos tradicionais (bacterioscopia e cultura do LCR) e a CIE forneceram resultados satisfatórios. A associação de pelo menos dois desses métodos aumentou significativamente a porcentagem de identificação dos casos de meningite meningocócica.

### INTRODUÇÃO

No decorrer de 1974 houve aumento crescente de casos de meningite meningocócica, internados no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Existia simultaneidade de epidemia no Município de São Paulo e em outras localidades do território nacional. Os recursos diagnósticos deste Hospital, na ocasião, para caracterizar a doença meningocócica, constavam de dados clínicos, bacterioscópicos, cultura do líquido cefalorraquiano (LCR) e hemocultura; todavia, apenas 38,5% de culturas positivas eram detectadas em amostras de LCR, compatíveis com meningite bacteriana e as culturas positivas para *N. meningitidis* não especificavam o tipo. Era necessário superar as limitações dos métodos diagnósticos até então utilizados. A

contraímuno-elektroforese para pesquisa de antígenos bacterianos no LCR<sup>5,8</sup> e a hemaglutinação passiva para detecção de anticorpos específicos de *N. meningitidis* no soro<sup>2,9</sup> poderiam eventualmente preencher tal finalidade. A fim de avaliar a contribuição destes dois métodos, juntamente com os tradicionais no diagnóstico da doença meningocócica, um estudo foi realizado com essa metodologia múltipla nos casos com suspeita de meningite bacteriana.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram selecionados, no período de agosto/1974 a agosto/1976, 108 pacientes, atendidos no Hospital das Clínicas da

Trabalho realizado no Serviço de Moléstias Infecciosas e Tropicais do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — USP e com a ajuda da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 12 — Médicas 74/1183)

- (1) Diretor de Serviço dos Laboratórios Especializados e Chefe do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da FMRP — USP
- (2) Prof. Livre-Docente
- (3) Prof. Titular e Chefe do Departamento de Clínica Médica

FMRP-USP com suspeita clínica de meningite e que apresentavam ao exame do LCR alterações bioquímicas e citológicas compatíveis com meningite bacteriana. A pesquisa da etiologia destas meningites foi realizada através dos seguintes exames: bacterioscopia do esfregaço do sedimento do LCR corado pelo Gram, cultura do LCR em ágar-chocolate, hemocultura em caldo de "Brain Heart Infusion", contraímuno-eletroforese (CIE) do LCR e hemaglutinação passiva (HP). Participamos diretamente da execução apenas dos dois últimos exames (CIE e HP); para os demais fizemos apenas coleta e análise dos resultados.

**Contraímuno-eletroforese do LCR** — para a pesquisa de polissacarídes meningocócicos A e C, de hemófilos tipo b e 82 tipos de pneumococos no LCR, utilizamos da técnica descrita por EDWARDS<sup>3</sup> e GREENWOOD & col.<sup>5</sup>. Os antisoros empregados foram: antimeningocócicos A e C (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo — SP), anti-hemófilos tipo b e antipneumocócico polivalente (Statens Seruminstitut — Dinamarca). O meio de suporte para a CIE foi agarose a 1%. Polissacarídes A e C (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo — SP), LCR positivo para pneumococo e LCR positivo para hemófilos tipo b na CIE serviram de controles da reação.

**Hemaglutinação passiva** — a pesquisa de anticorpos antimeningocócicos A e C em amostras pareadas de soro dos pacientes, foi baseada no trabalho de EDWARDS & DRISCOLL<sup>2</sup> e no manual de técnicas "Microtiter" de CONRATH<sup>1</sup>. Empregamos polissacarídes A e C de meningococo (Merk Sharp & Dohme) para sensibilizar hemácias, frescas tipo O Rh-negativo e soros antimeningocócicos (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo — SP) com títulos para HP respectivamente 1.024 e 2.048 como controles da reação.

## RESULTADOS

Embora nem todos os testes tenham sido aplicados simultaneamente, foram diagnosticados 71 casos (65,7%) de meningites meningocócicas (41 tipo A, 11 C, 2 A e C e 18 não tipadas), 9 (8,3%) por hemófilos tipo b, 6 (5,6%) por pneumococos, 2 (1,9%) por *E. aerogenes* e 1 (0,9%) por *Streptococcus* sp. Em 19 casos (17,6%) não foi possível identificar o agente etiológico. Na Tabela I pode ser analisada a contribuição de cada método utilizado para diagnóstico dos 71 casos de meningite meningocócica. A HP foi o método de mais alta positividade, 84,6% (33/39) e a hemocultura o que menos contribuiu, 29,4% (15/51). A CIE forneceu 60,3% (38/63) de resultados positivos, sendo pouco inferior à bacterioscopia, 67,9% (38/56) e à cultura do LCR, 71,6% (48/67). A Tabela II mostra que a associação de pelo menos dois desses métodos aumentou a porcentagem de positividade para diagnóstico de infecção meningocócica para 80% ou mais, principalmente quando a HP foi um dos métodos. A associação de cultura do LCR e CIE revelou 88,1% (52/59), resultado próximo da associação bacterioscopia mais cultura do LCR, ou seja 86,8% (46/53). O conjunto bacterioscopia + CIE contribuiu para elevar respectivamente as porcentagens de 67,9 e 60,3 para 80% (40/50). A associação bacterioscopia + cultura LCR + CIE resultou em 91,3% (42/46).

Entre os 89 casos de meningite bacteriana cuja etiologia foi determinada, em 11 não houve concordância entre os vários métodos utilizados. A análise deste problema permitiu que o diagnóstico etiológico fosse decidido quando nos baseamos nos resultados positivos encontrados em: CIE 7 casos, HP 1 caso, bacterioscopia 1 caso, cultura do LCR e/ou hemocultura 2 casos.

TABELA I

Contribuição de cada um dos métodos utilizados para o diagnóstico de 71 casos de meningite meningocócica

Totais de casos	Bacterioscopia LCR	Cultura LCR	CIE LCR	Hemocultura	HP
Positivos	38	48	38	15	33
Negativos	18	19	25	36	6
Realizados	56	67	63	51	39
Não realizados	15	4	8	20	32
% Positividade	67,9	71,6	60,3	29,4	84,6

T A B E L A II

Porcentagem de positividade obtida pela associação de métodos diagnósticos para infecção meningocócica

Métodos diagnósticos	Positividade %
Bacterioscopia + cultura LCR	86,8 (46/53)(*)
Bacterioscopia + CIE	80,0 (40/50)
Cultura líquor + CIE	88,1 (52/59)
HP + CIE	94,6 (35/37)
HP + bacterioscopia	97,0 (32/33)
HP + cultura LCR	97,2 (35/36)
Bacterioscopia + cultura LCR + CIE	91,3 (42/46)

(\*) Exames positivos/exames realizados

## DISCUSSÃO

A CIE tem sido considerada recurso valioso no diagnóstico das meningites meningocócicas, embora muitos casos confirmados clínica e bacteriologicamente apresentassem a CIE negativa (GREENWOOD & col.<sup>5</sup>). Este teste permite a tipagem dos meningococos, o que é de importância epidemiológica fundamental, pois permite caracterizar o tipo predominante, responsável pelo surto epidêmico, sendo de imenso valor na indicação da vacinação que é também tipo-específica (GOTSCHLICH & col.<sup>4</sup>). Vários Autores demonstraram a contribuição da HP no diagnóstico dessas meningites, através da detecção sorológica de anticorpos antimeningocócicos, igualmente útil em estudos epidemiológicos.

No presente trabalho também foi avaliada a contribuição da CIE e HP. De todos os métodos utilizados, o da HP foi o que possibilitou o maior número de resultados positivos e a hemocultura o que menos contribuiu, como também demonstraram MELLES & col.<sup>6</sup>. Embora a CIE tivesse fornecido resultados um pouco inferiores à bacterioscopia e à cultura do LCR, foi considerado como método rápido, sensível, específico e sujeito a um menor número de variáveis que porventura possam influir nos resultados da bacterioscopia e cultura do LCR. Tem a vantagem também de ser positiva, mesmo na vigência de antibioticoterapia.

MELLES & col.<sup>6</sup> e NAVES & col.<sup>7</sup> comparando diversos métodos diagnósticos verificaram respectivamente 28,4% e 37,8% de resultados positivos pela CIE do LCR em acetato de celulose, enquanto que os do presente trabalho foram 60,3%, empregando agarose como suporte.

Quanto aos dois casos de meningite meningocócica A + C não encontramos na revisão bibliográfica referência a respeito de reação cruzada entre os meningococos A e C. No Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, alguns testes de CIE que mostraram reação positiva para polisacárides A e C no mesmo LCR foram interpretados como devido a componentes bacterianos comuns para os soros antimeningocócicos A e C, excluídas as possibilidades de infecção mista (comunicação pessoal). No presente trabalho o soro antimeningocócico A foi testado individualmente contra o polissacáride C e o soro antimeningocócico C contra o polissacáride A, não ocorrendo reação cruzada. Os resultados referidos acima foram baseados em testes repetidos, com precipitações nítidas na CIE para os dois polissacárides A e C e também quando a HP confirmou a presença de anticorpos antimeningocócicos, com títulos que pudessem caracterizar a infecção mista.

A associação de dois métodos elevou os índices de positividade de infecção principalmente quando a HP era um dos métodos. O conjunto cultura de LCR + CIE revelou 88,1% de positividade de infecção meningocócica, mas a cultura de LCR + bacterioscopia elucidou índice próximo, 86,8%, embora a cultura não especificasse o tipo de meningococo. A associação de bacterioscopia, cultura de LCR e CIE mostrou o índice de 91,3%, enquanto que MELLES & col.<sup>6</sup> encontraram 73,7% para o mesmo conjunto. A maior porcentagem de positividade demonstrada por estes Autores foi 99,8%, correspondendo ao conjunto bacterioscopia + HP, que em nosso caso foi de 97%.

Verificamos que no período de estudo (agosto/74 a agosto/1976) a epidemia de meningite meningocócica que atingiu o Distrito Sanitário de Ribeirão Preto — SP, apresentou nítido predomínio do tipo A sobre o C, nas amostras de LCR testadas pela CIE e nas amostras de soro pela HP, na proporção de 4:1.

Pelo exame dos dados apresentados, consideramos como importante a contribuição da CIE e HP no diagnóstico da infecção meningocócica e sugerimos quando possível, o uso de todos os métodos analisados aqui, pois eles se complementam no processo de obter um maior número de resultados positivos no diagnóstico etiológico das meningites bacterianas.

## SUMMARY

### Counterimmuno-electrophoresis and passive hemagglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis

One-hundred-and-eight cases of bacterial meningitis admitted to the "Hospital das Clínicas" of Ribeirão Preto City (SP) Brazil, were studied by the bacterioscopy of Gram-stained smears of the sediment of cerebrospinal fluid (CSF), by CSF culture in chocolate-agar, by counterimmuno-electrophoresis (CIE) in order to detect A and C meningococcal polysaccharides, *Haemophilus* type b and 82 types of *Pneumococcus*, and by hemocultures. Passive hemagglutination (HP) test was also carried out in order to evaluate the titer of A and C anti-meningococcal antibodies in the serum.

Despite the fact that not every test was applied to each sample, 71 cases of *Meningococcus*, 9 cases of *Haemophilus* type b, 6 cases of *Pneumococcus*, 2 cases of *E. aerogenes*, 1 case of *Streptococcus* sp. were diagnosed, and for 19 other cases no etiological diagnosis could be made. Although its positivity is lower than bacterioscopy and CSF culture, CIE proved to be a sensitive, fast, specific and low-cost method, allowing identification of more than 60% of all diagnosed meningococci. HP was useful when employed in epidemiological studies, having the highest positivity.

The results suggest the use, whenever possible of all the methods analysed here, since they complement one another in the process of obtaining a greater number of positive results in the diagnosis of the etiology of bacterial meningitis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONRATH, T. B. — *Handbook of Microtiter Procedures*. Cambridge, Mass., Theodor B. Conrath, 1972; Section X, Subpart 1, pp. 70-77.
2. EDWARDS, E. A. & DRISCOLL, W. S. — Group specific hemagglutination test for *Neisseria meningitidis* antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 876-879, 1967.
3. EDWARDS, E. A. — Immunologic investigations of meningococcal disease. I. Group-specific *Neisseria meningitidis* antigens present in the serum of patients with fulminant meningococemia. *J. Immunol.* 106: 314-317, 1971.
4. GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y. & ARTENSTEIN, M. S. — Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharide. *J. Exp. Med.* 129: 1349-1365, 1969.
5. GREENWOOD, B. M.; WITTLE, H. C. & DOMINIC-RAJKOVIC, O. — Countercurrent immuno-electrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet* 2: 519-521, 1971.
6. MELLES, C. E. A.; RAMIRES, M. R. N.; DINIZ, J. M. P.; ADELINO, M. das G. F.; TAUNAY, A. de E. & ROSSI, C. V. — Estudo comparativo de métodos diagnósticos das meningites purulentas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20: 202-207, 1978.
7. NAVES, O. R.; ROCHA, V. & RIBEIRO, J. D. — Doença meningocócica, diagnóstico laboratorial; avaliação comparativa entre diferentes meios diagnósticos. *Rev. Pat. Trop.* 7: 161-165, 1978.
8. PALHARES, M.; GELLI, D. S.; ALMEIDA, M. C. R.; MELLES, C. E. A.; TAKEDA, A. K. & TAUNAY, A. E. — Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoelctroforese cruzada em acetato de celulose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 33: 85-89, 1973.
9. TAKEDA, A. K.; TAUNAY, A. E.; SCALABRINI, L. G. P. & CASTRO, I. O. — Anticorpos antipolissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*: detecção através da hemaglutinação passiva em soro de pacientes e vacinados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 34: 127-133, 1974.

Recebido para publicação em 10/11/1980.